مجله مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد دوم، شماره دوم، ۱۳۹۱
http://ejsms.gau.ac.ir

جداسازی و شناسایی ایزوله‌های *Azotobacter* و اندازه‌گیری فاکتورهای تحریک‌کنندگی رشد آن‌ها

***سودابه دولتی[۱]، محسن علمائی[۲]، مجتبی بارانی‌مطلق[۲] و عرازمحمد نوری‌راددوجی[۳]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، استان گلستان

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۹

چکیده

ازتوباکتر از باکتری‌های مهم منطقه ریزوسفر گیاهان زراعی می‌باشد. این پژوهش به‌منظور جداسازی جدایه‌های *ازتوباکتر* بومی استان گلستان تحت کشت گیاه سویا و بررسی پتانسیل‌های تحریک رشد در این باکتری‌ها به اجرا درآمد. پس از خالص‌سازی، ۳۰ جدایه انتخاب و توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی با روش احیاء استیلن به اتیلن، توانایی تولید اکسین و انحلال فسفر معدنی با روش رنگ‌سنجی و توانایی تولید سیدروفور با استفاده از محیط Cas-Agar مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان دادکه بین جدایه‌های مختلف از نظر توانایی تولید اکسین و تثبیت بیولوژیک نیتروژن تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیش‌ترین میزان تثبیت نیتروژن در جدایه $Az_{۲۶}$ (به‌میزان۴۲۸/۲۳ نانومتر در ویال بر هکتار) و کم‌ترین میزان آن در جدایه $Az_{۲۷}$ (به‌میزان ۲۱/۳۹ نانومتر در ویال بر هکتار) مشاهده شد، میزان تولید اکسین در جدایه $Az_{٤}$ حداکثر (۲۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر) و در جدایه $Az_{۲۰}$ حداقل (۰/۰۱۵۷ میلی‌گرم بر لیتر) بود، همچنین بیش‌ترین میزان تولید سیدروفور در جدایه $Az_{۹}$ و کم‌ترین میزان آن در جدایه $Az_{۱۸}$ به‌ترتیب با نسبت قطر هاله بر کلنی ٦/۳٦ و ۲/۲٤ در مدت ۷۲ ساعت مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: *ازتوباکتر*، ایندول استیک اسید، تثبیت بیولوژیک نیتروژن، سیدروفور، PGPR

* مسئول مکاتبه: soodabe.dolati@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ظرف چند دهه اخیر تلاش برای افزایش تولید در واحد سطح پیامدهایی از جمله مصرف زیاد و نامتعادل کودهای شیمیایی، به‌ویژه کودهای نیتروژنی را به‌همراه داشته است که علاوه‌بر افزایش هزینه تولید اثرات زیست‌محیطی نامطلوبی را به همراه داشته است. استفاده از کودهای بیولوژیک می‌تواند ضمن افزایش رشد موجب کاهش مصرف کودهای شیمیایی و آلودگی محیط و بهبود شاخص‌های کیفیت خاک و در نهایت کشاورزی پایدار شود. یکی از شیوه‌های بیولوژیکی برای افزایش تولید استفاده بالقوه از موجودات خاک‌زی مفید که توانایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن مولکولی یا تولید مواد محرک رشد گیاه را داشته، می‌باشد. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR[1])، گروه وسیعی از باکتری‌های خاک‌زی هستند که به‌طور مستقیم و غیرمستقیم موجب تحریک رشد و در نهایت افزایش عملکرد گیاهان می‌شوند. این گروه از موجودات در محیط ریشه (ریزوسفر) پتانسیل لازم برای اشغال سیستم ریشه گیاهان را دارند (وسی، ۲۰۰۳). ریزوسفر مکانی است که در آن‌جا اثرات متقابل بین خاک، گیاهان و میکروارگانیزم‌ها به‌وقوع می‌پیوندد. جوامع میکروبی ریزوسفر از نظر کمی و کیفی با جوامع میکروبی خاک غیرریزوسفری تفاوت بسیار زیادی دارد (لینچ، ۱۹۹۰). جنس *ازتوباکتر* نیتروژن مولکولی موجود در اتمسفر را به‌صورت آزاد تثبیت و وارد خاک می‌کند. این باکتری از جمله مهم‌ترین دی‌ازوتروف‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی به‌حساب می‌آید که در سال‌های اخیر توجه محققان کشور را به خود جلب کرده است. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده است که گونه‌های مختلف این باکتری را می‌توان در زمره انواع باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه نیز قرار داد. باکتری‌های جنس *ازتوباکتر* به‌طور مستقیم و به‌واسطه تثبیت نیتروژن مولکولی، افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصر غذایی و به‌خصوص تولید فیتوهورمون‌های رشد گیاهی (مانند اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و...) موجب بهبود شرایط تغذیه و رشد گیاه می‌شوند. این باکتری به‌علاوه از طریق کنترل عوامل بیماری‌زا، به‌طور غیرمستقیم، نیز به حفظ سلامت گیاه کمک نموده که تأثیر نهایی آن، بهبود رشد و عملکرد گیاهان زراعی می‌باشد (کادر و همکاران، ۲۰۰۲؛ مرکوواسکی و میلیک، ۲۰۰۱). افزایش قابلیت جذب Fe، Zn و Mo توسط *ازتوباکتر*، همچنین توانایی این باکتری در افزایش انحلال فسفر از ترکیبات نامحلول معدنی به اثبات رسیده است که از جمله روش‌های افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصر غذایی می‌باشد (مرکوواسکی و میلیک، ۲۰۰۱؛ نارولا و همکاران، ۲۰۰۰). به عقیده کندی

1- Plant Growth Promoting Rhizobacteria

www.SID.ir

و همکاران (۲۰۰٤) همبستگی نزدیکی بین رشد گیاه و هورمون‌های تولید شده توسط *ازتوباکتر* وجود دارد. کومار و نارولا (۱۹۹۹) توانایی انحلال فسفات معدنی در سویه‌هایی از *ازتوباکتر کروکوکوم* را گزارش نمودند. این دو محقق نشان دادند سویه M-15/*ازتوباکتر کروکوکوم* قادر است غلظت فسفر را در حضور تری‌کلسیم فسفات در حد ۱/۷۷ میکروگرم بر لیتر افزایش دهد.

سیدروفورها از دیگر متابولیت‌های تولید شده توسط *ازتوباکتر* می‌باشند که میل ترکیبی شدید با یون آهن سه‌ظرفیتی دارند. سیدروفورها در واقع نوع خاصی از حامل‌های یونی هستند که افزایش تحرک آهن را به عهده دارند. برخی سلول‌های میکروبی به‌منظور مقابله با تنش کمبود آهن اقدام به ترشح سیدروفور می‌کنند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که جدایه‌هایی از *ازتوباکتر* قادر به تولید سیدروفور در شرایط کمبود آهن می‌باشند و قابلیت تحرک آهن را در ریزوسفر افزایش می‌دهند (شیوپراساد و پیج، ۱۹۸۹). همچنین *ازتوباکتر* در شرایط نامساعد محیطی از جمله خشکی، کمبود مواد آلی و عناصر غذایی به حالت سیست[1] در می‌آید (ولا، ۱۹۷٤) و بنابراین استفاده از این باکتری در خاک‌های مناطق خشک ایران نیز می‌تواند مفید باشد.

ازتوباکتر شامل ۷ گونه به‌نام‌های *کروکوکوم*[2]، *وینلاندی*[3]، *بیجرینکی*[4]، *نیگریکانس*[5]، *آرمینیاکوس*[6]، *پاسپالی*[7] و *سالینستریس*[8] می‌باشد. *ازتوباکتر کروکوکوم* گونه غالب خاک‌های زراعی در مناطق معتدل می‌باشد. از ویژگی‌های این گونه تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای- سیاه نامحلول در آب است. این رنگ‌دانه به‌علت اکسیداسیون تیروزین به‌وسیله تیروژیناز که یک آنزیم مس‌دار است ایجاد می‌شود (بکینگ، ۲۰۰٦؛ کریج، ۲۰۰۵). *ازتوباکتر وینلاندی* از نظر مرفولوژی، شبیه *کروکوکوم* است. کلنی‌های آن مانند *کروکوکوم*، لزج نیستند. تولید رنگ‌دانه سبز- زرد محلول در آب از مشخصات این گونه است که در زیر نور فرابنفش به رنگ فلورسنت سبز- زرد دیده می‌شود. *ازتوباکتر بیجرینکی* توسط لیپمان (۱۹۰٤) شناسایی شد و به افتخار بیجرینک به این نام معروف شد. باکتری‌های این گونه، بدون توان حرکت می‌باشند.

1- Cyst
2- Chroococcum
3- Vinelandii
4- Beijerinckii
5- Nigricans
6- Armeniacus
7- Paspali
8- Salinestris

Archive of SID
www.SID.ir

نـام *ازتوبـاکتر نیگریکـانس* از کلمه نیگرا به معنای سیاه گرفته شده است. رنگ سیاه به‌دلیل تولید رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای- سیاه محلول در آب می‌باشد که توسط بعضی سویه‌های این گونه تولید می‌شـوند. سلول‌های رویشی ایـن گونه بدون توان حرکت هستند.

ازتوبـاکتر آرمینـاکوس اولین بار از خاک‌های جمهوری ارمنستان جداسازی شد، بـاکتری‌هـای این گونه دارای تاژک‌های پیرامونی متحرک، کلنی‌ها صاف با تحدب زیاد، براق و چسبناک هـستند. *ازتوبـاکتر آرمیناکوس* قادر نیست نیترات را به نیتریت و سیستئین و تیوسولفات را به H_2S تبـدیل کنـد کـه ایـن ویژگی‌ها در شناسایی این گونه از *نیگریکانس* اهمیت دارد.

ازتوباکتر پاسپالی تنها گونه ازتوباکتر است که با گیاه علفی پاسپالوم نوتاتوم[1] به روش همیاری قادر به تثبیت نیتروژن می‌باشد. این یکی از اختصاصی‌ترین انواع همیاری شناخته شده است (کریج، ۲۰۰۵).

برخی جدایه‌های *A. chroococcum* روی محیط‌های غذایی مایع متداول برای کـشت *Azotobacter* رشد نمی‌کنند. پیج (۱۹۸٦) با پژوهش روی انواعی از این جدایه‌ها، آن‌ها را *ازتوباکترهای* وابسته به سدیم نامید. پیج و همکاران (۱۹۹۱) پیشنهاد کردند که این انواع که رشد آن‌ها مشروط به‌وجود مقدار کافی سدیم در محیط است در گونه جدیدی به‌نام *ازتوباکتر سالینستریس* قرار گیرند (بکینگ، ۲۰۰٦؛ کریج، ۲۰۰۵).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: به‌منظور جداسازی *ازتوباکتر* نمونه‌برداری از مزارع سویا استان گلستان صورت گرفت و تعداد ۱٦ نمونه خاک از مزراع مختلف جمع‌آوری شد (تـاریخ نمونـه‌بـرداری ۱۳۸۹/٤/۱٤). اطلاعـات مربوط به مناطق نمونه‌برداری در جدول ۱ آورده شده است.

جداسازی و خالص‌سازی باکتری: از هر یک از نمونه‌های خاک ۱ گرم به ۱۰۰ سی‌سی آب معمـولی استریل شده در ارلن ۲۵۰ سی‌سی اضافه و ۱ ساعت شیک شد، سپس ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانـسیون به محیط کشت اختصاصی وینوگرادسکی مایع بدون نیتروژن که در لیتر شـامل: ۵۰ میلـی‌لیتـر محلـول وینوگرادسکی (در لیتر شامل: ۵ گرم فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم، ۲/۵ گرم سولفات منیزیم، ۲/۵ گـرم کلرید سدیم، ۰/۰۵ گرم سولفات آهن و ۰/۰۵ گرم سولفات منگنـز و pH نهـایی بـر روی ۷/۳ تنظـیم گردید)، ۱ میلی‌لیتر محلول عناصر کم‌مصرف (در لیتر شامل ۰/۰۵ گرم از هر یـک از امـلاح مولیبـدات پتاسیم، برات سدیم، نیترات کبالت، سولفات مس و سولفات روی است)، ۱۰ گـرم مـانیتول، ۰/۵ گـرم کربنات کلسیم و ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر است، اضافه شد و بـه‌مـدت ۷۲ سـاعت بـه‌منظـور مـشاهده

1- Paspalum Notatum

www.SID.ir

توانایی تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای شیک گردید سپس از این سوسپانسیون دارای کدورت رقت‌سازی انجام گرفت و از رقتی که تک‌کلنی‌های مناسب‌تری داشت بر روی محیط کشت وینوگرادسکی جامد به‌منظور خالص‌سازی کشت داده شد و پس از چند مرحله بازکشت کلنی‌های تیپیک بر روی محیط کشت اختصاصی وینوگرادسکی باکتری خالص‌سازی شد. این باکتری به شکل قطره‌ای و لعابی رشد کرده که با گذشت زمان به رنگ قهوه‌ای سوخته تا سیاه در می‌آید که بیانگر *ازتوباکتر* بودن آن‌ها می‌باشد. شناسایی ایزوله‌ها براساس روش میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی (تحرک، واکنش گرم، تشکیل سیست) و آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل آزمون کاتالاز، اکسیداز و تولید اسید از قند و تولید رنگ‌دانه بر روی جدایه‌ها صورت گرفت (رجائی و همکاران، ۲۰۰۷).

جدول ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری شده در استان گلستان براساس سیستم UTM.

نام منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
روستای نومل	۰۲۷۸۱۸۹	٤٠٨١٢٥٠
روستای اصفهانکلاته	۰۲۸۲۲٦٥	٤٠٨١٧٧٢
روستای مرزنکلاته	۰۲۸٥۳۱۷	٤٠٨٢٤٨٩
روستای حسن‌آباد	۰۲۸۸۲۹۱	٤٠٨٢٩٢٢
روستای دارکلاته	۰۳۱۷۷۷۰	٤٠٩٢٦٨٠
روستای دلند	۰۳۳۲۰٥۹	٤١٠٢٠١١
دشت حلقه	۰۳٤٦٤٨۷	٤١١٤۳٤٩
جاده گنبد- کلاله	۰۳٥۲۷۷٥	٤١٢٩١٧٧
کلاله	۰۳٦۰۰۱۳	٤١٢٩٧٩٥
جاده آزادشهر- مینودشت	۰۳٤٥۰٤٦	٤١١۳٥۳٨
دلند	۰۳۱٦۱۷٥	٤٠٩١٢٢٢
داخل اصفهانکلاته	۰۲٨٥٤۷۳	٤٠٨٢٦٩٥
سرخنکلاته ۱	۰۲٨۳٨۲٤	٤٠٨١٧١٦
سرخنکلاته ۲	۰۲٨۳٦٨۱	٤٠٨٤٠٠٠

آزمون‌های تشخیص گونه‌های *ازتوباکتر*

آزمون احیاء نیترات به نیتریت: هدف از انجام این آزمون، تعیین توانایی احیای نیترات به نیتریت، توسط باکتری‌های *ازتوباکتر* می‌باشد. محیط کشت مورد استفاده برای این آزمون در لیتر شامل: ۳ گرم Beef Extract، ٥ گرم Pepton و ۱ گرم KNO_3 است. پس از تلقیح و کشت ٤٨-٢٤ ساعتی باکتری

Archive of SID
www.SID.ir

در این محیط، از معرف‌های A و B استفاده شد. ابتدا چند قطره از معرف B (۸ گرم اسید سولفانیلیک در ۱ لیتر اسید استیک ۵ نرمال) اضافه کرده و سپس چند قطره از معرف A (۵ گرم آلفانفتیل آمین در حجم ۱ لیتر اسید استیک ۵ نرمال) استفاده می‌گردد. ایجاد رنگ قرمز نشانه احیای نیترات و وجود نیتریت در محیط می‌باشد و اگر تغییر رنگ مشاهده نشد نشانه منفی بودن این تست است. برای درک بهتر علت تغییر نکردن رنگ، مقداری پودر روی (Zn) به محیط کشت اضافه می‌گردد. چنان‌چه نیترات در محیط کشت وجود داشته باشد روی آن را به نیتریت احیاء نموده و رنگ قرمز در محیط پدید می‌آید. مشاهده رنگ قرمز در محیط بعد از افزودن پودر روی به آن نشان‌دهنده منفی بودن واکنش می‌باشد و اگر تغییر رنگ مشاهده نشد دلیل بر این است که دیگر نیترات در محیط نیست و به شکل گازی احیاء و تصعید شده و واکنش مثبت است. در بین گونه‌های *Azotobacter* تنها دو گونه *A. paspali* و *A. armeniacus* توانایی احیاء نیترات به نیتریت را دارا نمی‌باشند (رجب‌زاده، ۲۰۰۹).

آزمون مقاومت به فنول: گونه‌های مختلف *ازتوباکتر* به‌وجود فنول در محیط کشت حساس بوده و قادر به رشد در محیط دارای فنول نیستند تنها دو گونه *ازتوباکتر کروکوکوم* و *ازتوباکتر وینلاندی* قادر به رشد در محیط کشت دارای فنول ۰/۰۵ درصد می‌باشند (کریج، ۱۹۸٤). به این ترتیب به‌منظور جداسازی *ازتوباکتر کروکوکوم* و *وینلاندی* به محیط کشت جامد وینوگرادسکی ۰/۰۵ درصد فنول افزوده و توانایی ایزوله‌ها برای رشد بر روی این محیط بررسی شد.

آزمون مقاومت به بنزوات سدیم: در میان تمامی گونه‌های *ازتوباکتر* تنها *ازتوباکتر وینلاندی* قادر به رشد در محیط کشت دارای ۱ درصد سدیم بنزوات می‌باشد (کریج، ۱۹۸٤). با توجه به این قابلیت برای جداسازی *ازتوباکتر وینلاندی* از سایر گونه‌ها به محیط کشت جامد وینوگرادسکی ۱ درصد سدیم بنزوات افزوده و توانایی رشد ایزوله‌ها برروی این محیط بررسی شد.

آزمون‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه

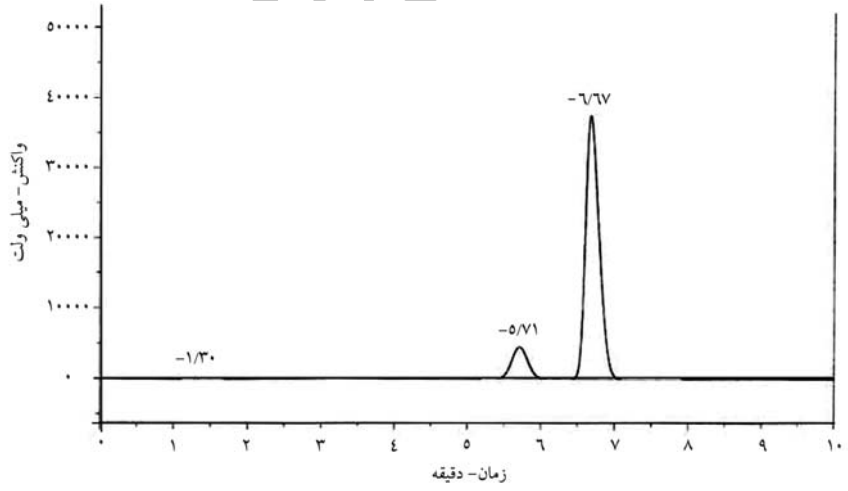
آزمون کمی توانایی تولید IAA: برای اندازه‌گیری کمی توانایی تولید IAA[1] محیط کشت مایع LB-T[2] تهیه که ترکیبات این محیط در هر لیتر شامل: ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم کلرید سدیم است و pH نهایی بر روی ۷/٤ تنظیم گردید و به این محیط ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر L-Tryptophan به‌عنوان پیش‌ماده تولید اکسین، اضافه شد و با سوسپانسیون میکروبی تازه، تلقیح و

1- Indole Acetic Acid
2- LB-Tryptophan (Luria-Bertani)

www.SID.ir

به‌مدت ٤٨ ساعت شیک گردید بعد از سپری شدن این زمان سوسپانسیون میکروبی سانتریفیوژ و محلول شفاف‌رویی به آرامی جدا و ١ میلی‌لیتر از این محلول به ٢ میلی‌لیتر معرف سالکووسکی (شامل ١٥٠ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ٢٥٠ میلی‌لیتر آب مقطر، ٧/٥ میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ ٠/٥ مولار) افزوده شد. در نهایت شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٥٣٠ نانومتر قرائت گردید و با استفاده از مقادیر قرائت شده برای استانداردها مقادیر اکسین تولید شده برای نمونه‌ها محاسبه شد (روبیو و همکاران، ٢٠٠٠) (جدول ٤).

آزمون توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن: به‌منظور بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکولی از روش احیاء استیلن به اتیلن (ARA[1]) استفاده شد. ٢ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی به لوله‌های آزمایش شامل محیط کشت مایع وینوگرادسکی (بدون نیتروژن) اضافه گردید، پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون، درب پنبه‌ای لوله‌ها با درهای پلاستیکی استریل تعویض شد و ١٠ درصد حجم هوای داخل لوله با سرنگ تخلیه و به همان میزان گاز استیلن به لوله‌ها تزریق گردید. پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون مجدد، ٠/٧ میکرولیتر از هوای داخل لوله با استفاده از سرنگ هامیلتون به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GOW_MAC) تزریق گردید و سطح زیر منحنی ایجاد شده قرائت شد (راویکومار و همکاران، ٢٠٠٤) (شکل ١).



شکل ١- نمونه‌ای از گراف دستگاه کروماتوگرافی گازی پیک اول مربوط به اتیلن و پیک دوم مربوط به استیلن می‌باشد.

1- Acetylene Reduction Assay

www.SID.ir

توانایی تولید سیدروفور: آزمون نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور با استفاده از محیط کشت Cas-Agar انجام گرفت. این محیط طبق روش اصلاح شده الکساندر و زامبر (۱۹۹۱) تهیه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به روش لکه‌گذاری روی پلیت‌ها تلقیح شد، توانایی تولید سیدروفور بر مبنای تغییر رنگ محیط کشت از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری قطر هاله نسبت به قطر کلنی باکتری در فاصله‌های زمانی ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت اندازه‌گیری و طبقه‌بندی شد (جدول‌های ۵ و ٦).

اندازه‌گیری کمی توانایی انحلال فسفر معدنی: ابتدا از کشت تازه باکتری یک حلقه پر به ۲۵ میلی‌لیتر محیط وینوگرادسکی تلقیح نموده و پس از سپری شدن ٤٨ ساعت ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۲۵ میلی‌لیتر محیط اسپربر (در لیتر شامل: ۱۰ گرم Glucose، ۰/۵ گرم Yeast Extract، ۱۵ گرم Agar، ۵ گرم $Ca_3(PO_4)_2$، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$ و ۰/۱ گرم $CaCl_2$) افزوده و در دور ۱۲۰ در دقیقه شیک شد. سپس در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ١٢٠ ساعت، ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون در دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و ۱ میلی‌لیتر از محلول بالایی با ۱ میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات و ۳ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه مخلوط می‌شود. نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفته و سپس مقدار جذب نور در طول موج ٤٧٠ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده توسط KH_2PO_4 محاسبه گردید. در ترسیم منحنی استاندارد ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر KH_2PO_4 با ۳ میلی‌لیتر محیط وینوگرادسکی (بدون تری‌کلسیم فسفات) و ۱ میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات- وانادات مخلوط و سپس میزان جذب نور در طول موج ٤٧٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- برخی خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های مختلف *ازتوباکتر* خاک‌های تحت کشت سویا در استان گلستان.

رنگ‌آمیزی گرم	تحرک	تشکیل سیست	تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای نامحلول در آب	آزمون کاتالاز	آزمون اکسیداز
گرم منفی	+	+	+	+	+

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به این نکته که تمام گونه‌های *ازتوباکتر* به‌استثناء *پاسپالی* و *آرمیناکوس* قادر به احیاء نیترات هستند از طرفی *ازتوباکتر پاسپالی* را تنها از ریشه گیاه *پاسپالوم نوتاتوم* می‌توان جداسازی کرد، نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های مربوط به جداسازی گونه را می‌توان در جدول ۳ خلاصه نمود.

جدول ۳- آزمون‌های مربوط به شناسایی و گروه‌بندی گونه‌های *Azotobacter spp*

گونه منسوب (پیشنهادی)	مقاومت به فنول ۰/۰۵ درصد	مقاومت به بنزوات سدیم ۰/۱درصد	تست احیاء نیترات به نیتریت	تعداد جدایه	شماره جدایه
A. chroococcum	+	−	+	۳۵	$Az_{۲}$–$Az_{۳}$–$Az_{٤}$–$Az_{۷}$–$Az_{۸}$–$Az_{۹}$–$Az_{۱۰}$–$Az_{۱۳}$–$Az_{۱٤}$–$Az_{۱۵}$–$Az_{۱٦}$–$Az_{۱۸}$–$Az_{۱۹}$–$Az_{۲۱}$–$Az_{۲۳}$–$Az_{۲۵}$–$Az_{۲٦}$–$Az_{۲۷}$–$Az_{۲۸}$–$Az_{۲۹}$–$Az_{۳۱}$–$Az_{۳۳}$–$Az_{۳٤}$–$Az_{۳٦}$–$Az_{۳۷}$–$Az_{۳۹}$–$Az_{٤۲}$–$Az_{٤۳}$–$Az_{٤٤}$–$Az_{٤۵}$–$Az_{٤٦}$–$Az_{٤۷}$–$Az_{۵۰}$–$Az_{۵۱}$–$Az_{۵۲}$
A. vinelandii	+	+	+	۱٤	$Az_{۱}$–$Az_{٦}$–$Az_{۱۱}$–$Az_{۲۰}$–$Az_{۲٤}$–$Az_{۳۰}$–$Az_{۳۲}$–$Az_{۳۵}$–$Az_{۳۸}$–$Az_{٤۱}$–$Az_{٤۸}$–$Az_{٤۹}$–$Az_{۵٤}$–$Az_{۵۵}$
A. armeniacus	−	−	−	٤	$Az_{۵}$–$Az_{۱۲}$–$Az_{۱۷}$–$Az_{۲۲}$

در بین ۲۳ جدایه *ازتوباکتر* مورد بررسی ۸۲/٦ درصد جدایه‌ها توان تثبیت نیتروژن مولکولی را از خود نشان دادند یا به‌عبارت بهتر میزان احیاء استیلن در ۸۲/٦ درصد جدایه‌ها به روش GC قابل اندازه‌گیری بود. بیش‌ترین میزان احیاء استیلن به اتیلن در جدایه $Az_{۲٦}$ و به‌میزان ٤۲۸/۲۳ نانومول اتیلن در لوله بر ساعت و کم‌ترین آن در جدایه $Az_{۱}$ (۰/۰۲ نانومول اتیلن در لوله بر ساعت) مشاهده شد. رجایی و همکاران (۲۰۰۷) توانایی تثبیت بیولوژیک نیتروژن مولکولی را در ٦۳ جدایه *Azotobacter* مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهش نشان داد که ۳٤ جدایه از این ٦۳ جدایه این توانایی را داشتند و بالاترین میزان آن۸/۳ نانومول اتیلن بر ساعت گزارش نمودند.

از بین ۲۳ جدایه بررسی شده در این آزمون بیش‌ترین میزان تولید IAA متعلق به جدایه $Az_{٤}$ و به‌میزان ۲۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر بود و کم‌ترین میزان آن ۰/۰۱۵۷ در $Az_{۲۰}$ مشاهده شد. میزان تولید IAA و اتیلن در این جدایه‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است. یاسمین و همکاران میزان تولید IAA

Archive of SID

www.SID.ir

توسط جدایه‌هایی از *ازتوباکتر*، *آزوسپریلیوم* و *باسیلوس* را با روش HPLC اندازه‌گیری نمودند و بیش‌ترین مقدار تولید IAA را برای بعضی جدایه‌های *ازتوباکتر* (۱۰±۹۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر) به‌دست آوردند. روبیو و همکاران (۲۰۰۰) حداکثر مقدار تولید IAA را در سویه‌های *ازتوباکتر کروکوکوم* در فاز ایستایی رشد گزارش نمودند.

همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌های مورد بررسی از نظر توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی و تولید اکسین وجود دارد.

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس میزان اکسین تولید شده و نیتروژن تثبیت شده در جدایه‌های *ازتوباکتر*.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		غلظت اکسین تولید شده (میلی‌گرم بر لیتر)	میزان نیتروژن تثبیت شده (نانومتر در ویال بر هکتار)
تکرار	۲	۰/۰۰۰۱	۷۸٤۷/۵۷
جدایه باکتری	۲۹	۱۰۰/۰٤۹**	٤۳٦۱٤/۱۵
خطا	۵۸	۰/۰۰۰۱	٤۷۱۱/۸
ضریب تغییرات		۰/۲۵	۱٤

نتایج به‌دست آمده از ارزیابی تولید سیدروفور نشان داد که ۱۹ جدایه از ۲۳ جدایه مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور را داشتند. نسبت قطر هاله به کلنی در ۷۲ ساعت بین ٦/۳٦-۲/۱۵ متغیر بود و ۸۲/٦۱ درصد جدایه‌ها این توانایی را دارا بودند. با توجه به یکسان بودن مقدار مایه تلقیح نسبت قطر هاله به کلنی می‌تواند معیار مناسبی برای مقایسه تولید سیدروفور بین جدایه‌ها باشد. بیش‌ترین میزان تولید سیدروفور در جدایه $Az_{۲٦}$ با نسبت قطر هاله بر کلنی ٦/۳٦ در مدت ۷۲ ساعت مشاهده شد. رجایی و همکاران (۲۰۰۷) توانایی تولید سیدروفور را در جدایه‌های *Azotobacter* مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهش نشان داد که از بین تمام جدایه‌ها تنها ۱۲ درصد آن‌ها در محیط کشت انتخابی Cas-Agar قادر به رشد نبودند و از بین ۸۷ درصد جدایه‌های رشدیافته بر روی محیط، بیش از ۹۰ درصد آن‌ها قابلیت تولید سیدروفورها را از خود نشان دادند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵- مقدار اکسین تولید شده و نیتروژن تثبیت شده در جدایه‌های مختلف *Azotobacter spp*.

شماره ایزوله	گونه	غلظت اکسین (میلی‌گرم بر لیتر) بعد از ٤٨ ساعت	میزان نیتروژن تثبیت شده (نانومتر در ویال بر هکتار)
$Az_{۱}$	*A. vinelandii*	۹/۸۹۱^{e}	۳٦/٦^{ef}
$Az_{۲}$	*A. chroococcum*	٦/۳۲۷۱^{g}	۱۷٥/۰۱^{cdef}
$Az_{٤}$	*A. chroococcum*	۲۷/۳۰۲۳^{a}	–
$Az_{٦}$	*A. vinelandii*	٤/۰۰۳٥^{h}	۱۸۳/۹۲^{cde}
$Az_{۷}$	*A. chroococcum*	۰/۷٥۳٦^{m}	۳۸/۷^{ef}
$Az_{۸}$	*A. chroococcum*	٦/۲٦٤۳^{g}	۲٦/۰٥^{ef}
$Az_{۹}$	*A. chroococcum*	۰/۲۳٥٥^{n}	۲۸۰/۱^{bc}
$Az_{۱۰}$	*A. chroococcum*	۲/۳۰۷۹^{k}	۱۷۹/۰۹^{cdef}
$Az_{۱۱}$	*A. vinelandii*	۰/۸۹٤۹^{m}	۲۷٥/٥۱^{bc}
$Az_{۱۲}$	*A. armeniacus*	۲/۷^{j}	٤۳۹/۷۹^{a}
$Az_{۱٥}$	*A. chroococcum*	٤/۰۱۹۲^{h}	۲۱۷/۸۸^{cd}
$Az_{۱٦}$	*A. chroococcum*	۳/٦۱۱^{i}	–
$Az_{۱۷}$	*A. armeniacus*	۲/۰۸۸۱^{l}	۱۸٥/٦^{cde}
$Az_{۲۰}$	*A. vinelandii*	۰/۰۱٥۷^{o}	۱۰٦/۰۸^{def}
$Az_{۲۱}$	*A. chroococcum*	۲/٦٥۳۳^{j}	–
$Az_{۲۲}$	*A. armeniacus*	۲/۱٦٦٦^{l}	۲٥٤/٦۱^{bcd}
$Az_{۲٥}$	*A. chroococcum*	۱۰/۹٤۲۹^{d}	۳۷۷/۰۹^{ab}
$Az_{۲٦}$	*A. chroococcum*	۲۲/۰٤۲۸^{b}	٤۳۲/۰۷^{a}
$Az_{۲۷}$	*A. chroococcum*	۱۱/۷۲۷۹^{c}	۲۱/۳۹^{f}
$Az_{۳۷}$	*A. chroococcum*	۰/۰۹٤۲^{n}	۱۰۷/۸۳^{def}
$Az_{٤٤}$	*A. chroococcum*	۹/۰۱۲^{f}	–
$Az_{٤۹}$	*A. vinelandii*	۰/۱٥۷^{n}	۱۱٦/۳۹^{def}
$Az_{٥۱}$	*A. chroococcum*	۲۳/٥۰۲۹^{b}	–

* حروف مشترک نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٦- طبقه‌بندی سویه‌های *ازتوباکتر* براساس نسبت قطر هاله بر کلنی در محیط کشت Cas-Agar.

کلاس	نسبت قطر هاله بر کلنی	فراوانی (درصد)
D	۰	۲۹/٦۳
C	۰/۵-۲	۲۹/٦۳
B	۲-٤	۲۹/٦۳
A	>٤	۱۱/۱۱

جدول ۷- مقایسه جدایه‌ها از نظر قطر کلنی و نسبت قطر هاله به کلنی در زمان‌های مختلف.

شماره ایزوله	گونه	نسبت قطر هاله به کلنی		
		۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت
$Az_{۱}$	*A. vinelandii*	۳/۳۲٤	۲/۵۸	۲/۲۹
$Az_{۲}$	*A. chroococcum*	۲/۰۷	۲/۳	۲/۳۲۵
$Az_{۳}$	*A. chroococcum*	–	–	–
$Az_{٤}$	*A. chroococcum*	۲/۰٦٤	۲/۵۵	۲/٦۷
$Az_{۵}$	*A. armeniacus*	۲/۰۸	۲/۱۵	۲/۳٦
$Az_{٦}$	*A. vinelandii*	۱/۹۹	۱/۲	۲/٤۷
$Az_{۷}$	*A. chroococcum*	۱/۹۲	۲/۵۳	۲/۷۳
$Az_{۸}$	*A. chroococcum*	۱/۷٤	۲/۵۵	۳/۰۳
$Az_{۹}$	*A. chroococcum*	۲/۹۸	۳/٤۱	۳/٦۳
$Az_{۱۰}$	*A. chroococcum*	۲/۷۹	٤/۸٦	٦/۱٤
$Az_{۱۱}$	*A. vinelandii*	۲/٦۳	۳/۰۲	۳/۳۲
$Az_{۱۲}$	*A. armeniacus*	۳/۰۱	۵/۰٤	۵/۹٦
$Az_{۱۳}$	*A. chroococcum*	–	۱/۳	۲/۲۸
$Az_{۱٤}$	*A. chroococcum*	–	۱/۹۸	۲/۳٤
$Az_{۱۵}$	*A. chroococcum*	–	۲/۱٤	۲/۳٦
$Az_{۱٦}$	*A. chroococcum*	–	–	۲/٤۱
$Az_{۱۷}$	*A. armeniacus*	–	۲/۲۳	۲/۳٦
$Az_{۱۸}$	*A. chroococcum*	–	۱/۸۲	۲/۲٤
$Az_{۱۹}$	*A. chroococcum*	–	۲/۲۳	۲/۷۲
$Az_{۲۰}$	*A. vinelandii*	–	–	–
$Az_{۲۱}$	*A. chroococcum*	–	–	–
$Az_{۲۲}$	*A. armeniacus*	–	–	–
$Az_{۲٦}$	*A. chroococcum*	۲/۵۲	٤/۸	٦/۳٦

Archive of SID

www.SID.ir

هیچ‌یک از جدایه‌های مورد بررسی توانایی انحلال فسفر معدنی را نداشتند. با توجه به این‌که باکتری در محیط انتخابی به‌خوبی رشد کرده و حتی با گذشت زمان تشکیل سیست می‌دهد و نشان‌دهنده این مطلب است که محیط اثر بازدارندگی روی رشد *ازتوباکتر* ندارد و نیاز به آزمایش‌های تکمیلی دارد. در یک پژوهش گارگ و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند *ازتوباکتر کروکوکوم* قادر است غلظت فسفر محلول را در محیط آبی در حضور سوبسترای آلی افزایش دهد. توانایی انحلال فسفات توسط *ازتوباکتر* توسط گایند و گائور نیز گزارش شده است (کومار و نارولا، ۱۹۹۹). از طرفی گروهی از محققان اعتقاد دارند *ازتوباکتر* به‌تنهایی قادر به انحلال فسفات‌های معدنی نبوده ولی تلقیح هم‌زمان آن با سایر باکتری‌های حل‌کننده فسفات اثر معنی‌دار و مفیدی روی رشد گیاه داشته، همچنین اثر باکتری‌های حل‌کننده روی رشد گیاه به‌همراه *ازتوباکتر* بیش‌تر از تلقیح این باکتری‌ها به‌تنهایی می‌باشد.

منابع

1.Alexander, D.B., and Zumber, D.A. 1993. Responses by iron-efficient and inefficient oat cultivars to inoculation with siderophore-producing bacteria in a calcareous soil, Biol. Fertil. Soils, 16: 118-124.

2.Becking, J.H. 2006. The family *Azotobacteraceae*. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (eds.). The prokaryotes, 2nd edn. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, Springer, Berlin Heidelberg New York, 4: 3144-3170.

3.Garg, S.K., Bhatnagar, A., Kalla, A., and Narula, N. 2001. *In vitro* nitrogen fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. Bioresource Technol. 9: 101-109.

4.Kader, M.A., Main, M.H., and Hoque, M.S. 2002. Effects of *Azotobacter* inoculant on the yield and nitrogen up take by wheat, J. Biol. Sci. 2: 259-261.

5.Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., and Keeskes, M.L. 2004. Non-symbiotic bacteria diazotrophs in crop-farming system: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. Soil Biology and Biochemistry. 16: 120-131.

6.Krieg, N.R. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins.

7.Kumar, V., and Narula, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphate and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutans, Biol. Fertil. Soils. 28: 301-305.

8.Lynch, J.M. 1990. The Rhizospher. John Wiley and Sons Ltd. Chicheseter. England, 300p.

9.Mrkovacki, N., and Milic, V. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potential useful in agricultural application, Ann Microbiol. 51: 145-158.

Archive of SID
www.SID.ir

10.Narula, N., Kumar, V., Behl, R.K., Deubel, A., Gransee, A., and Merbach, W. 2000. Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P and K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. J. Plant Nutr. Soil Sci. 163: 393-398.
11.Quispel, A. 1974. The Biology of Nitrogen Fixation, North Holand Publishing Company.
12.Rajabzade, F. 2009. Isolation, identification and application of *Azospirillum spp.* (PGPR) on rice growth in greenhouse condition. M.Sc. Thesis, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Pp: 93-142. (In Persian with English Abstract)
13.Rajaee, S., Raeesi, F., and Alikhani H. 2007. Evaluation ability of some *Azotobacter chroococcum* native soils of Chahar Mahal and Bakhtiari in Production PGPR materials. J. Agric. 30: 4. 33-47.
14.Ravikumar, S., Kathiresan, K., Ignatiammal, S.T.M., Selvam, M.B., and Shanthy, S. 2004. Nitrogen-fixation *Azotobacters* from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers, J. Exp. Marine Biol. Ecol. 15: 157-160.
15.Rubio, M.G.T., Plata, S.A., Castillo, J.B., and Nieto, P.M. 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter sp*.and *Pseudomonas sp*., producers of Indole-3-Acetic Acid and siderophores from Colombian Rice Rhizosphere, Revista Latinoamrican de Microbioloia, 5: 171-176.
16.Shivprasad, S., and Page, W.J. 1989. Catechole formation and melanization by Na^+-dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadatation. Environmental Microbiology, 55: 1811-1817.
17.Vella, G.R. 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil, Al Microbiol. 28: 77-79.
18.Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil. 255: 571-586.

Archive of SID

www.SID.ir

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 2(2), 2012
http://ejsms.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Isolation and identification of *Azotobacter spp* and evaluation of their plant growth promoting properties

***S. Dolati[1], M. Olamaee[2], M. Barani Motlagh[2] and A.M. Nouryrad Davaji[3]**

[1]M.Sc. Student, Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Research Instructor, Research Center of Agriculture and Natural Resources, Golestan Province

Received: 11/05/2011; Accepted: 11/09/2012

Abstract

Azotobacter is an important bacteria in crop rhizosphere. This research aimed the isolation of local *Azotobacter* under cultivation of soybean plant in Golestan province and their potential growth promoting-ability. After identification of 30 isolates their ability to molecular nitrogen fixation were tested with Acetylene to Ethylene reduction method. Their ability in auxin production and solubilizing the mineral P were tested with colorimetric method and sidrephore production potential was tested with Cas-agar medium. The maximum nitrogen fixation was in Az_{26} (428.23 nm.vial.h^{-1} ethylene) and minimum in Az_{27} (21.39 nm.vial.h^{-1} ethylene). Auxin production was highest in Az_4 isolate (27.3 mg/l) and lowest in Az_{20} isolate (0.0157 mg/l). Also maximum sidrephore production was in Az_9 and minimum in Az_{18} observed with diameter halo on colony of 6.36 and 2.24 in 72 hours respectively.

Keywords: *Azotobacter*, Auxin, Nitrogen fixation, Siderophore, IAA, PGPR

* Corresponding Authors; Email: soodabe.dolati@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir