نشریه زراعت
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۳، زمستان ۱۳۹۰

تولید آمونیاک آزاد توسط باکتری ها طی فرایند تثبیت ازت

• داریوش شکری
گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان (نویسنده مسئول)
• گیتی امتیازی
گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان
• سهیلا عباسی
گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان
تاریخ‌دریافت: مهر ماه ۱۳۸۸ تاریخ‌پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۸۴۰۷۱۸۳
Email: dariush.shokri61@yahoo.com

چکیده

آمونیاک یکی از منابع بسیار مهم نیتروژن برای گیاهان و میکروارگانیسم ها می باشد. باکتری های تثبیت کننده ازت, نیتروژن ملکولی را توسط کمپلکس آنزیمی نیتروژناز[1] به آمونیاک تبدیل می کنند که عمده این آمونیاک طی فرآیند جذبی[2] آمونیاک جذب سلول شده و ترشحی نمی باشد اما گزارش هایی موجود است که در برخی از باکتری های جهش یافته ی تثبیت کننده ازت, ترشح آمونیاک رخ می دهد. در این تحقیق تولید آمونیاک طی فرایند تثبیت ازت در باکتری های وحشی تثبیت کننده ازت مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا سویه های مختلف این باکتریها شامل اگروباکتریوم[3] پانی باسیلوس[4]، ریزوبیوم[5]، کلبسیلا اکسی توکا[6] و ازتوباکتر[7] از ریشه و خاک اطراف ریشه گیاهان مختلف از جمله نخود, شنبلیله, عدس, یونجه, لوبیا, گندم و برنج جداسازی شدند و سپس هرکدام آنها در دو محیط کشت بدون منبع نیتروژن (ازتو باکتر براث) با دو منبع مختلف قندی شامل مانیتول و ساکارز کشت داده شدند و بعد از یک هفته تولید آمونیاک در آنها توسط معرف نسلر[8] مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعدی ۳ سویه از باکتری پانی باسیلوس(E, H, SH) که دارای بهترین راندمان تولید بودند انتخاب شده و تولید آمونیاک در یک سیستم طراحی شده ی ابتکاری در سه آزمایش مختلف شامل (i حالت خشک شده باکتری (بیومس خشک[9]) بدون حضور ماده غذایی (ii در محیط مایع و (iii به صورت تر (بیومس تر[10]) قرار گرفته بر روی محیط جامد اسلنت، به مدت طولانی (۷ هفته) مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله آخر تولید آمونیاک در واکنش تثبیت ازت با تولید آمونیاک طی واکنش آمونیفیکاسیون[11] (توسط باکتری های غیر تثبیت کننده ازت) با یکدیگر مقایسه شد. نتایج نشان داد از بین کل ۳۵ سویه جداسازی شده, فقط ۷ سویه پانی باسیلوس قادر به تولید آمونیاک در طی فرایند تثبیت ازت بودند (با ماکزیمم تولید ۱۴/۲ میلی مولار در محیط ساکارز ازتو باکتر) و با کمک سیستم U شکل در سویه E پانی باسیلوس در حالت خشک شده بعد از یک هفته بیشترین مقدار تولید آمونیاک دیده می شود (۲۲میلی مولار). مقایسه تولید آمونیاک در واکنش آمونیفیکاسیون و واکنش تثبیت ازت (توسط باکتری پانی باسیلوس) نشان داد که تولید آمونیاک در پانی باسیلوس هم به مقدار بیشتر و هم به مدت طولانی‌تری انجام می‌شود. اهمیت این تحقیق تولید و جمع آوری گاز آمونیاک به صورت کاملاً جداگانه با یک روش جدید و ابتکاری می باشد.

کلمات کلیدی: آمونیاک، آمونیفیکاسیون، آنزیم نیتروژناز، باکتری های تثبیت کننده ازت

www.SID.ir

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 93 pp: 93-103

Investigation of free ammonium production by bacteria in nitrogen fixation process

By: D. Shokri, Biology Dept, Scienes Faculty, Isfahan University, (Corresponding Author; Tel: +989188407183) Emtiazi G. and Abassi S. Biology Dept, Sciences Faculty Isfahan University.

Ammonium (NH_3) is an important nitrogen (N) source for plants and microorganisms. Bacteria convert N_2 to NH_3 by nitrogenase complex in nitrogen fixation process and this NH3 is assimilated and not released. However, there are some reports that N fixation in some mutant bacteria may lead to NH3 secretion. In this study wild strains producers of NH3 through N fixation without use of any mutant, were investigated as there were few reports about them. So, NH3 production in different N fixing bacteria like Paenibacillus, Rhizobium, Azotobacter, Agrobacterium and *Klebsiella oxytoca*, isolated from soil and plant roots of alfalfa (*Medicago sativa*), lentil (*Lens culinaris*), bean (*Phaseolus luntus*), pea (*Pisum sativum*), wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*) was analyzed. NH3 production was assayed with Nessler reagent from bacteria cultured in two nitrogen-free medium (with two different carbon source including sucrose and mannitol) for one week. In the next stage, three strains of Paenibacillus (E, H, SH) with the highest NH_3 production were selected and by means of an innovative system, production of NH_3 in three different experiments (dry biomass of bacteria without any medium, in broth medium and wet biomass of bacteria located on slant medium) was assayed until production approached none (7 week). In the last stage, NH_3 production by these bacteria was compared with non-nitrogen fixing bacteria during the ammonification process. Results show that from the 35 different isolated strains, only Paenibacillus strains were able to produce NH3 during the process of N fixation and accordingly seven strains of Paenibacillus were isolated (14.2 mM at the highest). The results indicated that dry biomass of E strain of Paenibacillus produced the highest amount of NH_3 in the first week (22 mM). Paenibacillus produced greater amount of NH_3 and for a longer time in comparison with ammonifynig bacteria. This is a novel way for the production of free ammonium.

Key words: Ammonium; Ammonification; Nitrogen fixing bacteria; Nitrogenase enzyme

Archive of SID

مقدمه

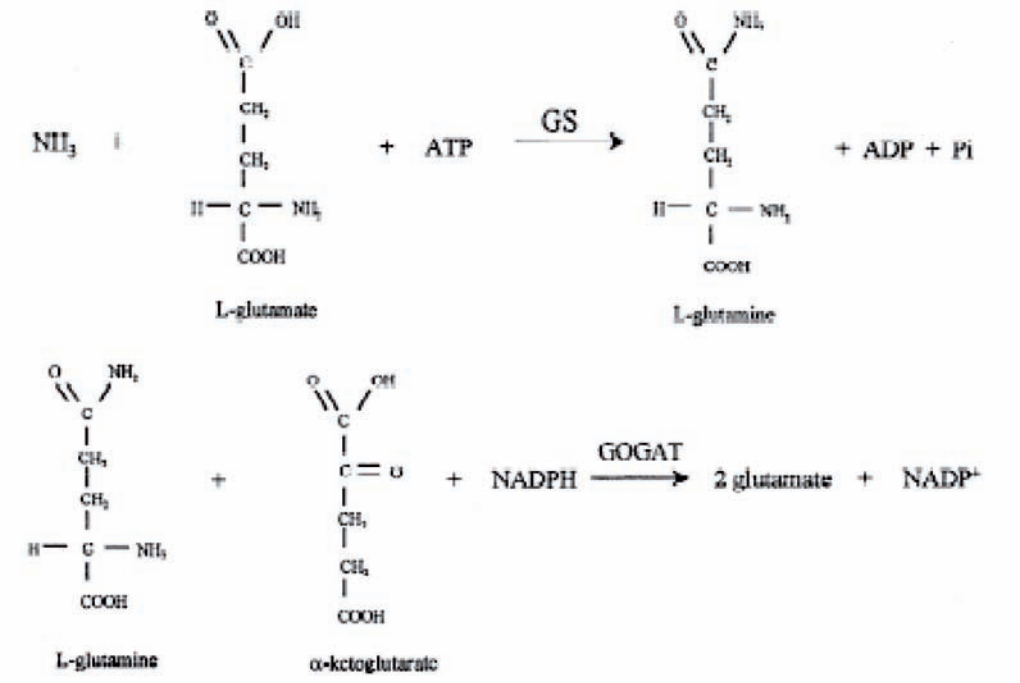
آمونیـاک یکـی از مهم ترین ترکیبات عنصر نیتروژن اسـت که معمولاً برای تولید کودهای شـیمیایی اسـتفاده می شـود زیرا این ماده حاوی نیتروژن اسـت که برای رشـد گیاهان مهم و ضروری اسـت (۴، ۷، ۹، ۱۰). کمپلکـس آنزیمی نیتروژناز موجود در باکتری های تثبیت کننده ازت، طی فرآیند جذبی آمونیاک، نیتروژن ملکولی را به آمونیاک تبدیل می کند و در واقع این آنزیم مسئول تثبیت N_2 می باشد. این آمونیاک بلافاصله با کمک دو آنزیم گلوتامین سنتاز[۱۲] (GS) و گلوتامات سنتاز[۱۳] (GOGAT) در مسـیر آنزیمـی گلوتامین سـنتاز- گلوتامات سـنتاز جذب سلول می شـود، به این ترتیب محصول فرایند تثبیت ازت یعنی آمونیاک توسـط آنزیم گلوتامین سنتتاز جذب می شود. در این واکنش آمونیاک با گلوتامات ترکیب می شود و گلوتامین حاصل می شود. آنزیم GOGAT گلوتامیـن را با آلفاکتوگلوتـارات ترکیب می کند و دو عدد گلوتامات حاصل می شود (۶،۵،۳):

در جهش یافته های با نقص در GOGAT، گلوتامات می تواند از طریق آمین دار شدن آلفاکتوگلوتارات بوسیله گلوتامات دهیدروژناز[۱۴] (GDH) نیز تولید شـود (۱۱، ۱۳). گلوتامـات منبع گروه های آلفا آمینوی همه اسـیدهای آمینه، نیمـی از نیتروژن در حلقه هـای پیریمیدین، پورین و ایمیـدازول و همچنین گروه آمینوی آدنین می باشـد. گلوتامین نیز نیتـروژن NAD، آمین قندها، پارا آمینوبنزوئیک اسـید (PABA) و دیگر نیتروژن های پورین، پیریمیدین، هیستیدین و تریپتوفان را تامین می کند.

بنابراین آمونیاک تولیدی وارد مسیرهای بیوسنتزی سلولی برای ساخت ترکیبات نیتروژن دار می شـود و آزاد شـدن آمونیاک رخ نمی دهد. اما در برخـی از گزارش های موجود به علت جهش در آنزیم های، GDH یاGS GOGAT و سیسـتم های وابسته سلول توانایی جذب آمونیاک تولید شـده در طی فرایند تثبیت ازت را از دسـت می دهد و ترشح این ماده به محیط کشت رخ می‌دهد (۱۹،۱۵،۱۴،۱۲،۱).

اولیـن گزارش در مـورد باکتری هـای تولیدکننده آمونیـاک در مورد سـویه های جهـش یافتـه ای از *Klebsiella pneumonia* بود که در توانایـی جـذب آمونیـاک دچار نقـص بودند. این سـویه ها در ژن glnA کـه GS را کـد می کنـد نقصی نداشـتند بلکه در یـک یا هر دوی مسـیرهای دیگـر فرایند جذبی آمونیاک دچـار نقص بودند یعنی آنزیـم های GOGAT و GDH. زمانی که GS باعث تولید گلوتامین می شد عدم حضور GOGAT و GDHمانع تولید گلوتامات می شود. در این جهش یافته ها آمونیاک حاصل شـده از فعالیت نیتروژناز جذب

www.SID.ir



نگردیـده و به خارج ترشـح می شـود و باعث افزایش میـزان آمونیاک در محیط می شـود (۵). در طی واکنش آمونیفیکاسـیون ترکیبات آلی ازت دار توسـط میکروارگانیسـم ها تجزیه شـده و در اثـر این تجزیه آمونیـاک آزاد می شـود (۲، ۱۳، ۱۶) که درباره ایـن فرایند تحقیقات مختلفی انجام شـده است اما در تحقیق پیش رو تولید آمونیاک در طی واکنش تثبیت ازت در باکتری های وحشـی تثبیت کننده ازت که یک راه جدید برای تولید آمونیاک می باشد مورد بررسی قرار گرفته است که گزارش های خیلی کمی راجع به آن موجود اسـت و گزارشهای موجود بر روی جهش یافته هایی که باعث ترشـح آمونیاک به محیط می شوند متمرکز هستند و این ترشح در باکتری های وحشی به صورت معدودی بررسی شده است (۱۷، ۱۸).

مواد و روش ها

جداسازی باکتری های مورد مطالعه

– **ریزوبیـوم:** بـرای جداسـازی سـویه هـای مختلـف ریزوبیـوم از گرهک های موجود در ریشـه گیاهان مختلف از جمله نخود، شـنبلیله، عدس، یونجه و لوبیا استفاده شد. پس از جداسازی این غده ها از ریشه، اسـتریل آنها در کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۵-۲ دقیقه (بسـته به اندازه گرهک) انجام شد و بعد از ۳ بار شستشو توسط آب مقطر استریل، غده ها در داخل محیط ریزوبیوم (محیط عصاره مخمر مانیتول آگار[۱۵] یا YEMA) له شـده تا باکتری های موجود در داخل این غده ها در این محیط رشد کنند (۱۳، ۱۹).

– **پانی باسـیلوس:** برای جداسـازی سـویه های مختلف این باکتری نمونه‌های خاک از ریزوسـفر گیاهانی مثل گندم، برنج و یونجه ساییده و الک شـده و سپس ۱۰ گرم از آن را به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه روی Shaker قرار داده و سپس آن را به‌مدت ۱۰ دقیقـه در بن‌ماری ۸۰ درجه سـانتی‌گراد شـوک حرارتی داده و ۱ میلی لیتر از آن را روی پلیت حاوی محیط جامد ازتوباکتر (محیط جامد مانیتول آگار فاقد نیتروژن) ریخته و با روش Spread plate در سطح پلیـت پخش می‌کنیم و به‌مدت یـک هفته در داخل جار بی‌هوازی قرار می دهیم (۱۷، ۱۸).

– ***Kl.oxtitoca*:** برای جداسـازی این باکتری از ریشـه گیاه گندم و برنج اسـتفاده شـد به این ترتیب که تارهای کشنده این گیاهان توسط کلرورجیوه ۰/۱ اسـتریل گشته و سـپس در محیط ائوزین متیلن بلو[۱۶] (EMB) له گشته و بعد از ۲۴ ساعت کلنی های این باکتری جداسازی گشت (۴، ۵).

– **ازتوباکتر:** نمونه‌های مختلف خاک را ساییده و الک می کنیم سپس آنرا به صورت نمک پاش در سـطح محیط کشـت ازتـو باکتر آگار می پاشیم. پس از یک هفته کلنی های لزج کرمی رنگ یا متمایل به زرد را جداسازی می کنیم (۱۲،۱، ۱۵).

همچنین در این تحقیق از دو سـویه اسـتاندارد آگروباکتریوم بنام های A۴ و LBA۹۴۰۲ استفاده شد.

رشد باکتری ها به منظور بررسی تولید آمونیاک

تمامـی باکتـری های مـورد مطالعه پس از جداسـازی در محیط های اختصاصـی، به منظور بررسـی تولید آمونیاک طـی تثبیت ازت، در دو محیط کشـت مایع فاقد منبع نیتـروژن (یکی محیط ازتـو باکتر آگار بـا منبع کربن مانیتول و دیگری محیط ازتـو باکتر آگار با منبع کربن سـاکارز) به مدت ۱ هفته رشد داده شـدند. چونکه این محیط ها فاقد هر گونه منبع نیتروژنی است و از آنجایی که در واکنش آمونیفیکاسیون

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیــه منابع نیتروژنی روی می دهد، بنابراین در صورت تولید آمونیاک مــی توان نتیجه گرفت که این آمونیاک تولیدی در اثر تثبیت ازت و نه در اثر واکنش آمونیفیکاسیون بوده است.

رسم منحنی استاندارد آمونیاک

برای رســم منحنی اســتاندارد آمونیاک ابتدا ۲۶۴ میلی گرم ســولفات آمونیــوم را در یک لیتــر آب مقطر حل کرده تا محلــول ۴ میلی مولار آمونیاک به دست آید. از این محلول سری رقت بین ۰ تا ۴۰ میلی مولار ســاخته شده و ســپس به ۰/۵ میلی لیتر از این رقت ها، ۹/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر معرف نسلر اضافه شد و بلافاصله جذب نوری هر کدام در طول موج ۴۱۰ نانومتر با کمک دســتگاه اسپکتروفتومتر[۱۷] خوانده شــد و با کمــک برنامــه Microsoft office Excel ۲۰۰۳ منحنی استاندارد آمونیاک رسم شد (شکل ۱).

بررسی تولید آمونیاک

تولید آمونیاک در باکتری های جداســازی شــده توسط معرف نسلر مورد بررســی قرار گرفت که در اثــر تولید آمونیاک با این معرف محیط کشــت باکتری به رنگ زرد تا قهوه ای در می آید سپس جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد آمونیاک مقدار کمی آمونیاک تولیدی بدست آمد.

تولید آمونیاک با کمک لوله U شکل

۳ ســویه مختلــف پانی باســیلوس بنام هــایH، E وSH کــه دارای بیشــترین میزان تولید آمونیاک در محیط مایع (در مرحله قبل) بودند انتخاب شــدند. ازآنجایی که گاز آمونیاک به راحتی در آب حل شــده و تولید هیدروکســید آمونیوم می کند، در مرحله بعد برای جداسازی گاز آمونیاک تولیدی طی تثبیت ازت و واردسازی آن به فاز آبی یک سیستم ساده ابتکاری به شرح زیر طراحی شد:

دو لوله آزمایش که یکی حاوی باکتری در حالت های مختلف و دیگری حــاوی آب مقطر به منظــور جمع آوری گاز آمونیاک تولیدی اســت را توســط یک لوله رابط U شــکل به هم وصل کرده و سر لوله ها را کاملاً مســدود کرده تا محیط نسبتاً بی‌هوازی ایجاد شود (شکل۲). در مرحله بعدی در لوله اول در آزمایشــات ابتکاری زیر تولید آمونیاک در ۳ سویه باکتری به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت:

حالت اول: رسوب غنی شده باکتری (بیومس تر) حاصل از ۵ میلی لیتر محیط ازتوباکتر براث[۱۸] با منبع قندی ســاکارز ازکشت یک هفته ای آن توسط سانتریفیوژ محیط (۱۰ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰) به دست آمده و در لوله اول بر روی محیط اســلنت این محیط قرار داده شد و در لوله دوم ۵ میلــی لیتر آب مقطر قرار گرفــت. این مرحله به صورت جداگانه برای هر ۳ سویه انجام گرفت.

حالت دوم: در لوله اول کشــت یک هفته ای از باکتری در ۵ میلی لیتر محیط مایع ازتوباکتر براث با منبع قندی ســاکارز و در لوله دوم ۵ میلی لیتر آب مقطر قرار گرفت. این مرحله به صورت جداگانه برای هر ۳ سویه انجام گرفت.

حالــت ســوم: رســوب حاصل از ۵ میلی لیتر باکتــری در محیط مایع ازتوباکتــر براث با منبع قندی ســاکارز (کشــت یک هفته) که توســط ســانتریفیوژ (۱۰ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰) به دست آمد، خشک شده (بیومس خشــک) و بدون اینکه از محیط و ماده غذایی خاصی استفاده شــود در لوله اول قرار گرفت و در لوله دوم ۵ میلی لیتر آب مقطر قرار گرفت. این مرحله به صورت جداگانه برای هر ۳ سویه انجام گرفت.

تمام محیط های بالا در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گذاری شده و تــا ۷ هفته که تولید آمونیاک در هر ۳ ســویه باکتری به صفر رســید آزمایشــات ادامــه یافت، به ایــن ترتیب که بعد از هــر هفته لوله دومی حاوی آب مقطر را جدا کرده و به آن میزان ۰/۲۵ سی سی معرف نسلر اضافه شده و جذب نوری آن در طول موج۴۱۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتری قرائت می شد سپس مجدداً در لوله دوم ۵ میلی لیتر آب مقطر جدید قرار داده و آن را به سیستم وصل کرده و به این ترتیب آزمایشات تا ۷ هفته ادامه یافت.

مقایسه تولیدآمونیاک طی تثبیت ازت و طی واکنش آمونیفیکاسیون در لوله U شکل

بــه منظــور مقایســه میــزان آمونیــاک تولیــدی طــی تثبیــت ازت در باکتری های فوق و طی واکنش آمونیفیکاسیون در باکتری های غیر تثبیت کننده ازت، از سه باکتری گرم مثبت *Str.faecalis*،*L.monocytogenes* و *Sta. aureus* اســتفاده شد که میزان تولید آمونیاک در این باکتری ها شبیه حالت سوم در مرحله قبلی در سطح خشک (بیومس خشک) به مدت ۷ هفته در لوله U شکل مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیــه و تحلیل آماری داده‌ها در صورت لزوم، با اســتفاده از نرم‌افزارهای SPSS (آنالیز واریانس یک راهه[۱۹] و آزمون $T^{۲۰}$) و Excel انجام شد.

نتایج

۳۵ ســویه مختلف باکتری جداسازی و توســط تست های بیوشیمیایی شناســایی جنس انجام گردیــد (۱، ۴، ۵، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹). درکل ۱۶ ســویه مختلف ریزوبیوم، ۱۵ ســویه مختلف پانی باسیلوس، ۲ ســویه ازتوباکتر و ۲ ســویه *Kl.oxtitoca* جداسازی شد (شکل۳). نتایج نشــان داد در بین کل باکتری های فوق فقط ۷ ســویه از باکتری پانی باســیلوس دارای قدرت تولید آمونیاک هســتند کــه در اثر اضافه کــردن معــرف نســلر بلافاصله بــه رنــگ زرد متمایل به قهــوه ای در می آیند (شــکل۴) و بقیه باکتری ها فاقد توانایی تولید آمونیاک بودند. نتایج این مرحله در دو محیط ازتوباکتر مانیتول آگار و ازتوباکتر ساکارز آگار در مورد ۷ ســویه پانی باسیلوس در شــکل ۵ آمده است که نتایج نشــان می دهد باکتری ها در محیط ازتوباکتر ساکارز آگار دارای تولید بســیار بیشتر آمونیاک هســتند و با کمک آنالیز آماری داده ها (آزمون T) مشخص شــد این اختلاف معنی دار است ($P<۰/۰۵$). باکتری پانی باســیلوس ســویه E بهترین تولیدکننــده آمونیاک بــود و دارای تولید آمونیــاک به مقــدار ۵/۵ میلی مولار در محیط ازتوباکتــر مانیتول آگار و ۱۴/۲ میلــی مولار در محیط ازتوباکتر ســاکارز آگار می باشــد. نتایج تولید آمونیاک در لوله U شــکل در حالات مختلف برای ۳ ســویه پانی

Archive of SID

www.SID.ir

باسیلوس که در مرحله قبلی دارای بالاترین میزان تولید آمونیاک بودند (H، E وSH) و مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است در شکل های ۶، ۷ و ۸ نشان داده شده است. این نتایج نشان داد در هر سه حالت فوق سویه E دارای میزان بالاتر تولید آمونیاک بوده و از بین این ۳ حالت مختلف در حالت سوم که فقط باکتری های خشک شده (بیومس خشک) بدون حضور هیچ محیط کشت و ماده غذایی حضور داشتند بالاترین میزان تولید آمونیاک در هر ۳ سویه مشاهده شد (بالاترین میزان در سویه E به مقدار ۲۲ میلی مولار بعد از یک هفته) و سپس در حالت اول که رسوب غنی شده باکتریها (بیومس تر) بروی محیط کشت اسلنت قرار گرفت میزان تولید بالاتری دیده شد (به میزان ۱۵/۷ میلی مولار بعد از یک هفته). میزان تولید آمونیاک توسط واکنش آمونیفیکاسیون در ۳ باکتری غیر تثبیت کننده ازت (*Sta.aureus L.monocytogenes* و *Sta.facalis*) در شکل ۹ دیده می شود. همانطور که از این شکل معلوم است میزان تولید آمونیاک در باکتری استافیلوکوک آرئوس از دو باکتری دیگر بیشتر است (به میزان ۵/۷۹ میلی مولار بعد از یک هفته) اما این میزان تولید در طی واکنش آمونیفیکاسیون توسط این سه باکتری نسبت به تولید آمونیاک در طی واکنش تثبیت ازت توسط باکتری پانی باسیلوس که در مرحله قبل دیده شد بسیار کمتر بوده و در زمان کوتاهتری یعنی در هفته ششم در هر سه باکتری فوق صفر می شود.

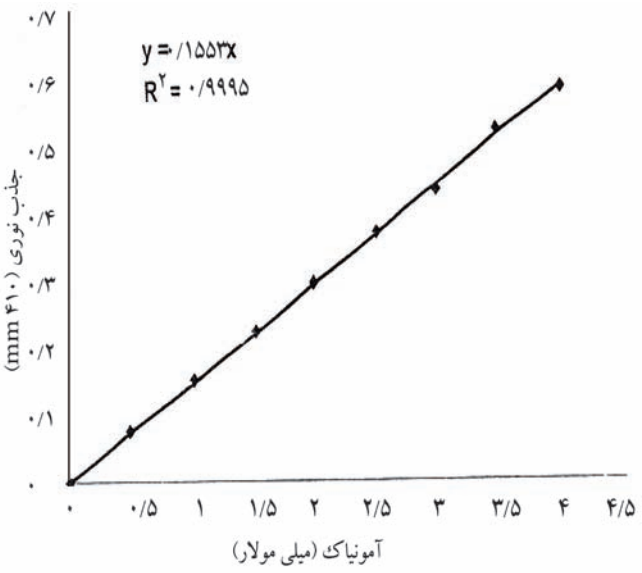
بحث و نتیجه‌گیری

آمونیاک یکی از بهترین منابع نیتروژن مورد استفاده برای گیاهان و باکتری می باشد که برای رشد بیشتر باکتری ها و ازدیاد محصول می تواند مورد استفاده قرار گیرد و امروزه از آن برای ساختن کودهای شیمیایی نیتراته از جمله سولفات آمونیوم که جزو کودهای عالی به حساب می آید استفاده می شود (۲، ۸، ۱۰). در این تحقیق تولید آمونیاک در طی فرایند تثبیت ازت در باکتری های وحشی تثبیت کننده ازت شامل پانی باسیلوس، ریزوبیوم، ازتوباکتر، اگروباکتریوم و کلبسیلا اکسی توکا و نیز مقایسه این میزان با تولید آمونیاک در طی فرایند آمونیفیکاسیون مورد بررسی قرار گرفت که گزارش های خیلی کمی راجع به آن موجود بوده و در مقاله های قبلی بیشتر برروی سویه های موتان یافته تولید کننده کار شده است، برای مثال آقای Colnaghi و همکاران در سال ۱۹۹۷ با استفاده از مواد شیمیایی جهش زا که باعث ممانعت از فعالیت آنزیم GS می شوند، موفق شده اند جهش یافته هایی از باکتری ازتوباکتر وینلاندی ۲۵ بدست آورند که تولید مقدار ۱۵mM آمونیاک می کنند (۵). همچنین آقای Ball وهمکاران در سال ۱۹۹۲ جهش یافته هایی از همین باکتری را بدست آورده اند که تا مقدار ۳۵ میلی مولار تولید آمونیاک در طی فرآیند تثبیت ازت می کنند (۱). نتایج نشان داد در بین باکتری های مورد بررسی فقط برخی از سویه های پانی باسیلوس دارای قدرت تولید آمونیاک در طی فرایند تثبیت ازت بوده و بقیه باکتری ها فاقد این توانایی بودند. آقای Shanmugam و Valentine در سال ۱۹۷۵ با کمک دستکاری های ژنتیکی بر روی آنزیم های کلیدی نیتروژناز و گلوتامات سنتاز، باکتری جهش یافته ای را بدست آوردند که به میزان ۲۰/۲ میکرومولار به ازای هر میلی گرم پروتئین تولید آمونیاک می کرد (۱۹). سویه های پانی باسیلوس مورد مطالعه در تحقیق حاضر به طور مستقیم از خاک و ریشه اطراف گیاهان مختلف جداسازی شدند و هیچ گونه دستکاری بر روی آنها انجام نگرفته است. این احتمال مطرح است که این سویه ها به طور ذاتی فاقد آنزیم هایی هستند که در جذب آمونیاک تولیدی در تثبیت ازت دخالت دارند و بنابراین آمونیاک تولید شده جذب نگردیده و به محیط آزاد می شود. سویه های پانی باسیلوس در محیط ازتوباکتر ساکارز آگار دارای تولید بسیار بالاتری نسبت به محیط ازتوباکتر مانیتول آگار بودند. تنها تفاوت این دو محیط در منابع قندی استفاده شده در آنها می باشد، بنابراین تفاوت تولید آمونیاک در این محیط ها به منبع کربن آنها مربوط است. ساکارز یک دی ساکارید است که از دو قند گلوکز و فروکتوز تشکیل شده است و این باکتری ها نسبت به قند مانیتول که یک قند منوساکاریدی است دارای رشد بهتر و متعاقب آن تولید بالاتر آمونیاک در آن بودند. در این تحقیق برای اولین بار به منظور تولید آمونیاک از یک سیستم ابتکاری استفاده شد و هدف این بود که بتوان آمونیاک را به صورت نسبتاً خالص بدست آورد. به همین منظور یک سیستم ساده که در قسمت مواد و روش ها توضیح داده شد طراحی گردید. با کمک این سیستم میزان قابل ملاحظه ای آمونیاک به صورت کاملاً جدا از باکتری های تولید کننده ی آن در یک ظرف که فقط حاوی آب مقطر بود به دست آمد و مشاهده گردید توسط بیومس خشک باکتری ها بیشترین میزان آمونیاک نسبت به بیومس تر یا محیط مایع تولید می شود. در حالت خشک شده بدون حضور ماده غذایی به علت عدم وجود رشد بیشتر، باکتری ها قادر به مصرف آمونیاک تولیدی نیستند و علاوه بر آن برخلاف دو حالت دیگر کل آمونیاک تولیدی در لوله مقابل که حاوی آب مقطر است جمع می شود. در قسمت دیگری از این تحقیق تولید آمونیاک توسط باکتری پانی باسیلوس در طی تثبیت ازت با تولید آن در طی واکنش آمونیفیکاسیون توسط سه باکتری *Sta.auveus*، *L.monocytogenes* و *Sta.facalis* با یکدیگر مقایسه شد. مبنای انتخاب این باکتری ها این بود که تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تثبیت ازت توسط این سه باکتری گزارش نشده است و می توان مطمئن بود که تولید آمونیاک توسط آنها فقط به واکنش آمونیفیکاسیون مربوط است. مقایسه ی تولید آمونیاک در واکنش آمونیفیکاسیون و واکنش تثبیت ازت نشان داد باکتری های غیر تثبیت کننده ازت طی واکنش آمونیفیکاسیون مقداری آمونیاک تولید می‌کنند که هم میزان آن کمتر می‌باشد و هم در مدت زمان کوتاهتری صفر می‌شود. درحالی که تولید آمونیاک در پانی باسیلوس هم به مقدار بیشتر و هم به مدت طولانی‌تری انجام می‌شود. تولید آمونیاک در این سیستم U شکل از آن جهت دارای اهمیت است که گاز آمونیاک تولیدی در طی تثبیت ازت به صورت کاملاً جداگانه در لوله ای مجزا جمع آوری می شود و این یک روش تازه برای تولید این ماده بسیار مهم توسط باکتری ها می باشد. در کل این تحقیق یک کار جدید برای تولید آمونیاک می باشد. با توجه به حلالیت و سهولت دسترسی آمونیاک آزاد برای باکتری و گیاه پیشنهاد می شود تحقیقات آینده بر اثر باکتری های تولید کننده آمونیاک بر رشد و نمو گیاهان و باکتری ها متمرکز شوند.

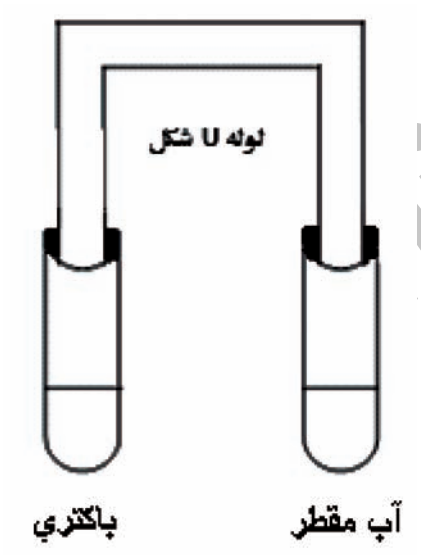
Archive of SID

جدول ۱- مشخصات سه سویه مختلف پانی باسیلوس به نام های SH ، H ، E

صفات	پانی باسیلوس E	پانی باسیلوس H	پانی باسیلوس SH
رنگ‌آمیزی گرم	+	+	+
پیگمان	-	-	-
مورفولوژی سلول	باسیل ـ اسپور	باسیل ـ اسپور	باسیل ـ اسپور
اکسیداز	-	-	-
کاتالاز	+	+	+
رشد در تیوگلیکولات	+	+	+
نشاسته	-	+	+
TSI	+	+	+
سیترات	-	-	-
گلوکز	+	+	+
سوکروز	+	+	+
گزیلوز	+	+	+
سوربیتول	+	+	+
آدونیتول	-	-	+
ترهالوز	-	-	+
لاکتوز	-	+	+
آرابیتوز	-	-	-
مانوز	+	+	+
متیل‌رد	-	-	+
لسیتیناز	-	-	+
رشد در برین هاری اینفودی برات BHI	+	-	+
SIM	-/-/+	-/-/+	-/-/+
احیای نیترات	+	+	+

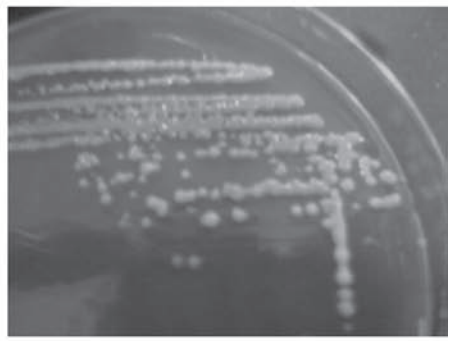


شکل ۱- منحنی استاندارد آمونیاک

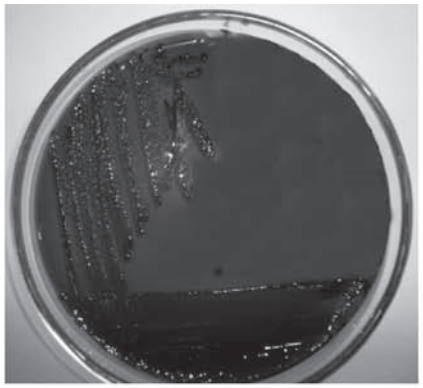


شکل۲- سیستم ساده طراحی شده به منظور تولید آمونیاک

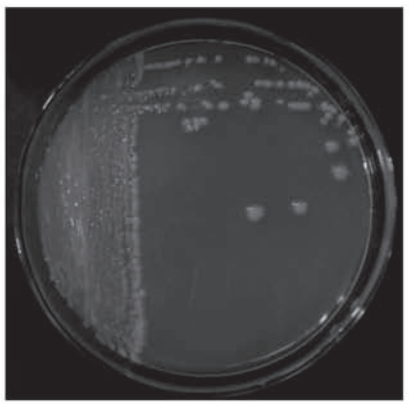
www.SID.ir

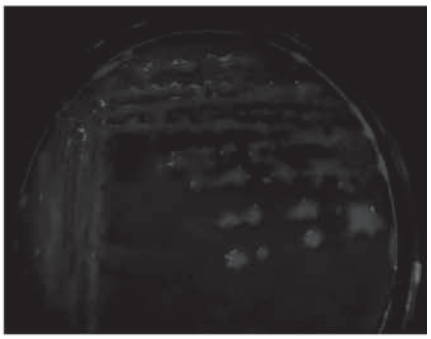


الف- کلنی خالص اگروباکترویوم بر روی محیط YEMA

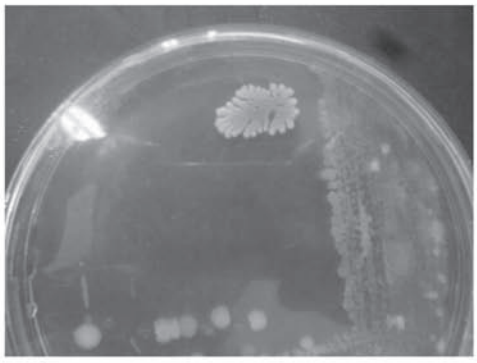


ب- کلنی خالص کلبسیلا اکسی‌توکا بر روی محیط EMB





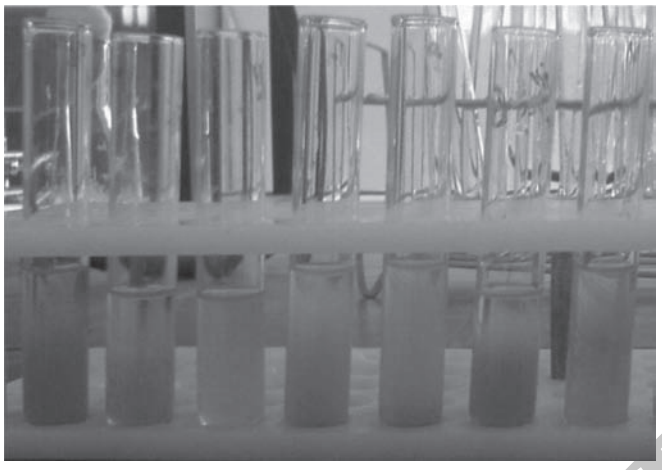
ج- دوکلنی خالص از دو سویه مختلف ریزوبیوم بر روی محیط YEMA



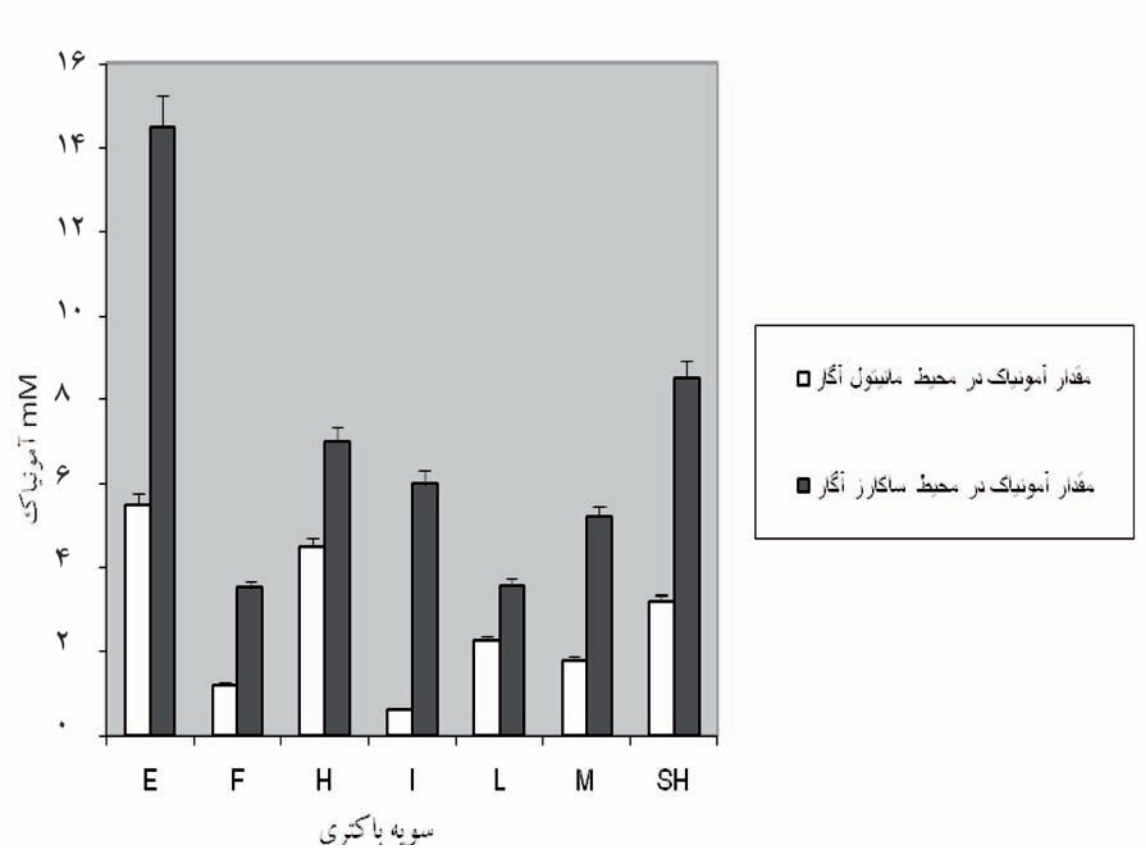
د- کلنی خالص پانی‌باسیلوس بر روی محیط ازتوباکتر آگار

شکل ۳- برخی از کلنی های خالص جدا شده ی باکتری ها بر روی محیط های اختصاصی

www.SID.ir

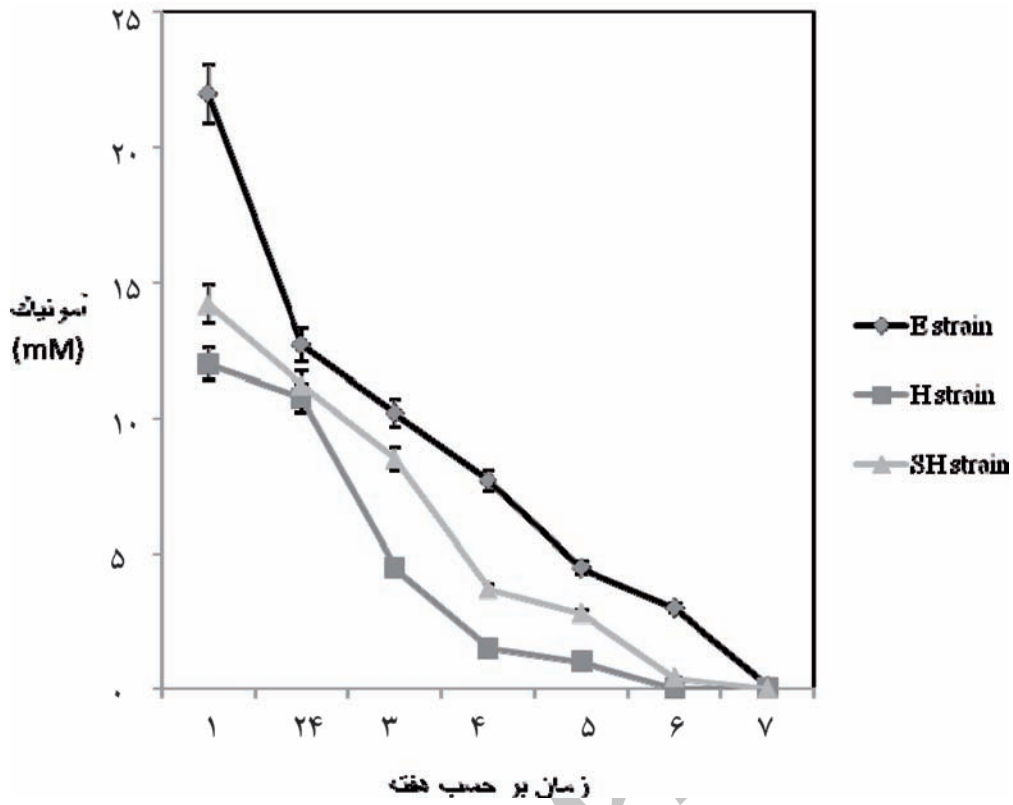


شکل ۴- زرد شدن محیط کشت باکتری های پانی باسیلوس بعد از اضافه کردن معرف نسلر در اثر تولید آمونیاک

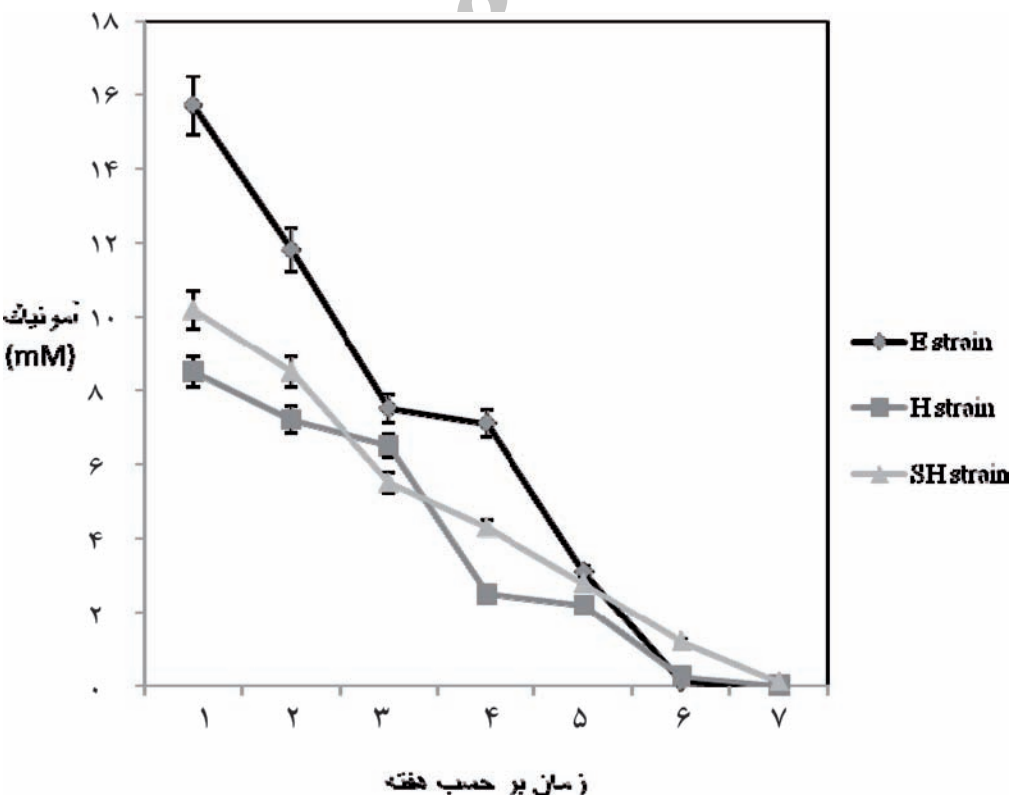


شکل۵- میزان آمونیاک تولید شده در ۷ سویه پانی باسیلوس طی یک هفته در محیط مایع

www.SID.ir
Archive of SID

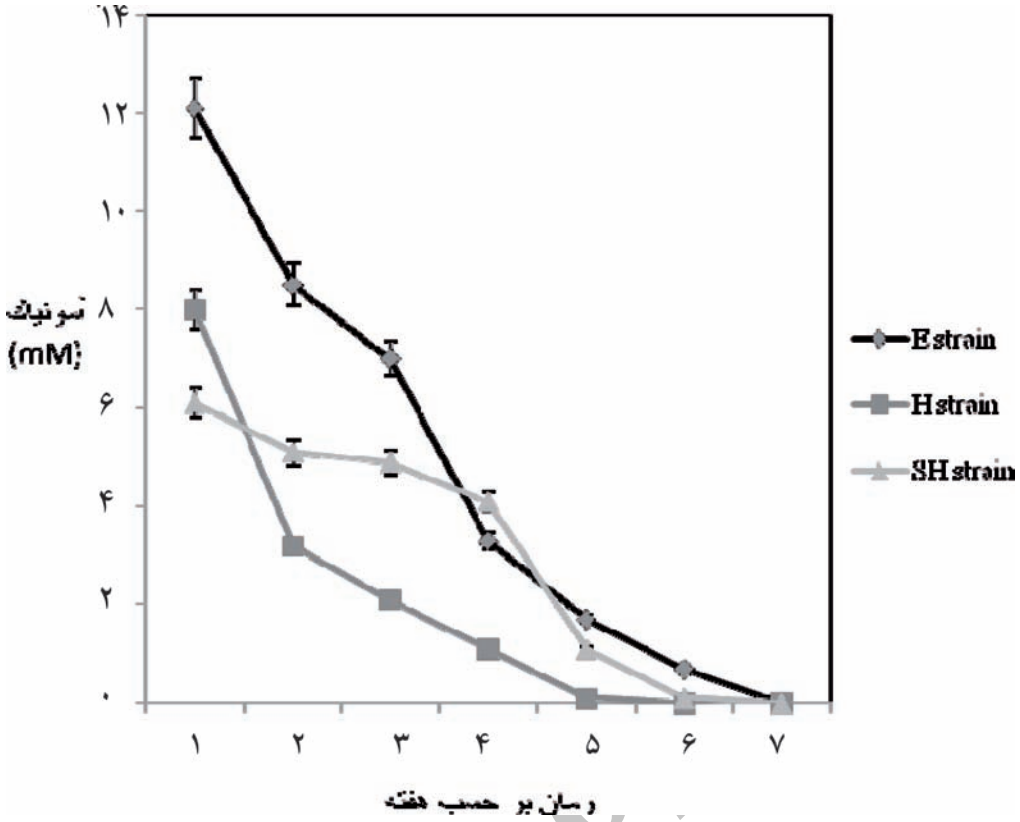


شکل۶- تولید آمونیاک در سطح خشک (بیومس خشک) به مدت ۷ هفته در لوله U شکل توسط سه سویه پانی باسیلوس

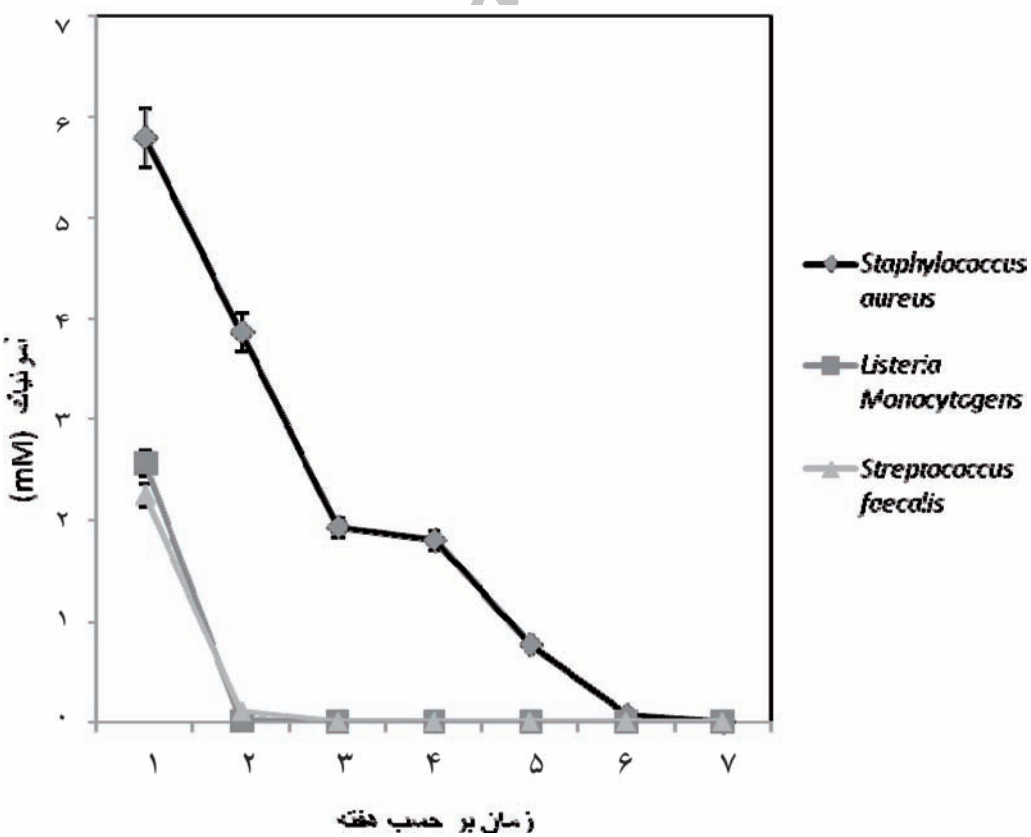


شکل۷- تولید آمونیاک توسط بیومس تر قرار گرفته بر روی محیط اسلنت به مدت ۷ هفته در لوله U شکل توسط سه سویه پانی باسیلوس

www.SID.ir



شکل۸- تولید آمونیاک در محیط مایع به مدت ۷ هفته در لوله U شکل توسط سه سویه پانی باسیلوس



شکل۹- تولید آمونیاک توسط باکتری های غیر تشبیت‌کننده ازت در لوله U شکل

نشریه زراعت www.SID.ir

سپاسگزاری

از دانشـــگاه اصفهان به خاطر حمایت مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می شود.

پاورقی ها

1- Nitrogenase
2- Assimilation
3- Agrobacterium
4- Paenibacillus
5- Rhizobium
6- *Klebsiella oxytoca*
7- Azotobacter
8- Nessler reagent
9- Dry biomass
10- Wet biomass
11- Ammonification
12- Glutamine synthetase
13- Glutamate synthase
14- Glutamate dehydrogenase
15- Yeast Extract Mannitol Agar
16- Eosin Methylene Blue
17- Spectrophotometer
18- Azotobacter Broth medium
19- One Way ANOVA
20- T-Test

منابع مورد استفاده

1- Ball, A.; Blanco, G.; Hill, S.; Kennedy, CH., (1992) Excretion of ammonium by a nifL mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. Applied and Environmental Microbiology, 58: 1711-1718.

2- Barbosa, H.R.; Yhulber, D.S.; Shirakawa, M.A.; Miyasaka, R.S., (2000) Beijerinchia derxii stimulates theability of non- fixing bacteria in nitrogen-free media. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:168-173.

3- Castillo, A.; Taboada, H.; Mendoza, A.; Valderrama, B.; Encarnacion, S.; Mora, J., (2000) Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in Rhizobium etli. *Microbiology*, 46: 1627–1637.

4- Celen, E.; Kilic, M.A., (2004) Isolation and characterization of aerobic denitrifiers from agricultural soil. *Turk Journal of Biology*, 28: 9-14.

5- Colnaghi, R.; Green, A.; He, L.; Rudnick, P.; Kennedy,C., (1997) Strategies for increased ammonium production in free-living or plant associated nitrogen fixing bacteria. *Plant and Soil*, 194: 145–154.

6- Dommelen, A.V.; Keijers, V.; Vandereyden, J.; Zamaroczy, M., (1998) (Methyl) ammonium transport in the nitrogen fixing bacterium Azospirillum brasilense. *Journal of Bacteriology*, 180: 2652-2659.

7- Dommelen, A.V.; Keijers, V.; Wollebrants, A.; Vanderleyden, J., (2003) Phenotypic changes resulting from distinct point mutations in the Azospirillum brasilense glnA gene, encoding glutamine synthetase. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5699-5701.

8- Doyle, M.E., (2006) Nanotechnology: A brief literature review. *Applied and Environmental Microbiology*, 127: 1484–1492.

9- Fuhrman, J.A.; Horrigan, S.G.; Capone, D.G., (1998) Use of N13 as tracer for bacterial and algal uptake of ammonium from seawater. *Marine Ecology*, 45: 271-278.

10- Hamilton, I. R.; Burris, R.H.; Wilson, P.W., (1956) Pyruvate metabolism by a nitrogen-fixing bacterium. *Biochemistry Journal*, 10: 96-383.

11- Kanamori, K.; Weiss, R.L.; Roberts, J.D., (1989) Ammonia assimilation pathways in nitrogen-fixing Clostridium kluyverii and Clostridium butyricum. *Journal of Bacteriology*, 171: 2148-2154.

12- Kleiner, D.; Kleinschmidt, J. A., (1976) Selective inactivation of Azotobacter nitrogenase vinelandii batch cultures. *Journal of Bacteriology*, 1: 117-122.

13- Moloney, A.H.; Guy, R.D.; Layzell, D.B., (1994) A model of the regulation of nitrogenase electron allocation in legume nodules. *Plant Physiology*, 104: 541-550.

14- Narula, N.; Gupta, K.G., (1986) Ammonia excretion by Azotobacter chroococcum in liquid culture and soil in the presence of manganese and clay minerals. *Plant and Soil*, 93: 205-209.

15- Partridge, C.P.D.; Yates, M.G., (1983) Effect of chelating agents on hydrogenase in Azotobacter chroococcum. *Biochemistry Journal*, 204: 339-344.

16- Rasche, M.E.; Arp, D.J., (1986) Hydrogen inhibition of nitrogen reduction by nitrogenase in isolated soybean nodule bacteroids. *Plant Physiology*, 91: 663-668.

17- Santos, S.C.C.D.; Rodrigues, M.R., (2002) Seldin, L. Evaluation of the diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains by using the DNA of bacteriophage IPy1 as a probe in hybridization experiments. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 52-56.

18- Seldin, L.; Elisa, J.D.V.; Penido, G.C., (1982) Bacillus nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant and Soil*, 70: 243-255.

19- Shanmugam, K.T.; Valentine, R.C., (1975) *Microbial production of ammonium iron from nitrogen.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72: 136-139.

Archive of SID