فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۷

بررسی توان تثبیت ازت توسط سویه های *Azospirillum* spp. جدا شده ازخاک پارک های جنگلی تهران

عباس اخوان سپهی*[۱]، احمد اصغرزاده[۲] بهناز ابراهیمی[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۲- مؤسسه تحقیقات خاک و آب

چکیده

در این تحقیق نمونه برداری از ۴ پارک جنگلی چیتگر، سرخه حصار، سوهانک و توسکا از مناطق پوشش گیاهی و مناطق بکر از عمق ۳۰-۰ سانتی متر تهیه شد. برای جداسازی سویه های *Azospirillum* spp. ازمحیط کشت اختصاصی نیمه جامد NFb(Nitrogen free malate) و RC(Rodriquez Caceres) استفاده شد و برای تایید از تست های بیوشیمیایی استفاده گردید. برای تعیین جمعیت از روش MPN(Most Probably Number) استفاده گردید. در این روش با استفاده از محیط کشت Rennie وکروماتوگرافی گازی تبدیل استیلن به اتیلن میزان تثبیت ازت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق، نمونه های جداسازی شده را *A.brasilense* ، *A.lipoferum* و*A.irakense* نشان داد. بطور میانگین میزان جمعیت آزوسپیریلوم با استفاده از محیط جامد NFb و RC به ترتیب در منطقه پوشش گیاهی $۴/۳\times۱۰^{۵}$ و$۱/۹۱\times۱۰^{۵}$ و در منطقه بکر $۱/۴۳ \times ۱۰^{۵}$ CFU/g و$۰/۷۷ \times ۱۰^{۵}$ و در محیط نیمه جامد درمنطقه ی پوشش گیاهی $۹/۵\times۱۰^{۲}$ CFU/g و درمنطقه ی بکر $۲/۷ \times ۱۰^{۲}$ CFU/g تعیین گردید. میزان تثبیت ازت در *A.lipoferum* از دو گونه دیگر بیشتر بوده و برابر ۸۶/۲۷ nmol/24Tube است. این میزان در *A.irakense* از همه کمتر و برابر ۲۳/۹۲ nmol/24Tube تعیین شد. در گونه *A.brasilense* میزان تثبیت ازت ۵۶/۴ nmol/24Tube تعیین گردید.

واژگان کلیدی: آزوسپیریلوم، MPN، تثبیت ازت و کروماتوگرافی گازی

مقدمه

استفاده از میکروارگانیسم های خاکزی به منظور افزایش رشد و تولید گیاهان از اوایل قرن بیستم آغاز شد ولی به دلیل اثرات سریع و آنی کودهای شیمیایی، سهولت در کاربرد و قیمت ارزان آنها سبب شد که کودهای بیولوژیک مورد استقبال قرار نگیرند و برای مدتهای مدیدی به بوته ی فراموشی سپرده شوند. در ۳۰ سال اخیر، به دلیل آشکارشدن اثرات سوء مصرف بی رویه کودهای شیمیایی و قیمت رو به تزاید آنها، مجدداً استفاده از کودهای بیولوژیکی در کشاورزی مطرح شده است. به نظر می رسد که افزایش قیمت های اخیر نفت، تمایل را به طرف استفاده از کودهای بیولوژیک دوچندان کرده است. آزوسپیریلوم یکی از باکتری های مورد توجه در کودهای بیولوژیک است که امروزه به عنوان محرک رشد گیاه (Plant Gowth Promoting Bacterium- PGPB) شناخته شده و قادر است که بر روی افزایش محصول اکثر

Archive of SID

www..SID.ir

گیاهان زراعی اثر بگذارد که از نظر اکولوژیکی و کشاورزی حائز اهمیت است. آزوسپیریلوم علاوه بر توان قابل توجهی که برای بهبود رشد گیاهان میزبان خود نشان می دهند به دلایلی نظیر وسعت انتشار جغرافیایی، طیف وسیع گیاهان میزبان، تنوع گونه ای و تحمل بعضی از گونه ها به تنشهای محیطی و به دلیل اثرات سینرژیستی بیش از سایر انواع مورد توجه و بررسی قرار گرفته است. عامل دیگری که مؤثر بر روی گیاهان می باشد، توانایی تثبیت ازت این باکتری است که بسیار مورد توجه است (۱).

آزوسپیریلوم ها باکتریهای درشت، اندکی خمیده و میله ای شکل، به ابعاد ۳/۸μm-۱/۲×۱/۷-۰/۶ و اغلب با انتهای نوک تیز، حاوی دانه های درون سلولی پلی بتاهیدروکسی بوتیرات (Poly-Beta Hydroxy Butyrate)، گرم منفی یا گرم متغیر و در محیط حاوی چربی بوسیله تاژه قطبی منفرد قادر به حرکت هستند. تثبیت کننده نیتروژن جو بوده و تحت شرایط میکروآئروفیلیک نیز می تواند نیتروژن را تثبیت نمایند. دمای بهینه رشد آنها ۴۱-۳۳ °C و pH نیز بین ۷/۵-۵/۵ متغیر است. برخی از سویه ها در محیط Potato Agar ایجاد کلنی های صورتی روشن می کنند که معمولاًچین خورده و لزج هستند. معمولاً دارای زندگی آزاد بوده ولی با ریشه ها، ساقه ها، برگها و دانه ها، زندگی همیاری دارند که بیشتر این نوع زندگی با گیاهان گندمی و علف های علوفه ای دیده می شود (۶).

گونه های معروف این جنس *A.lipoferum, A.amazonense, A.brasilense, A.doebereinerae, A.largimobile, A.halopraeferense, A.irakense* می باشند (۳،۱۳). آزوسپیریلوم ها در سراسر جهان منتشر شده و تعداد زیادی از آن در ریزوسفر خاک و در ارتباط با ریشه گیاهان، ساقه و برگهای انواع گیاهان مختلف وجود دارد. *A.amazonense* از ریشه های ذرت، ذرت خوشه ای، گندم، علف های علوفه ای، درختان نخل، ریشه و ساقه ی نیشکر و از میوه های آناناس و نارگیل جدا شده است.

Azospirillum lipoferum, Azospirillum brasilense در سال ۱۹۷۹ (۶)، *Azospirillum largimobile* در سال ۱۹۸۳ (۶)، *Azospirillum amazonense* در سال ۱۹۸۴ (۶)، *Azospirillum halopraeferense* در سال ۱۹۸۷ (۶)، *Azospirillum irakense* در سال ۱۹۹۱، *Azospirillum doebereinerae* درسال ۲۰۰۱ (۶)، *Azospirillum oryzae* (۲۴) در سال ۲۰۰۵ و *Azospirillum melinis* درسال ۲۰۰۶ (۱۷) از نمونه های گیاهی مختلف جدا سازی شدند.

مطالعات بر روی جداسازی آزوسپیریلوم بسیار زیاد انجام شده ولی بطور اختصاصی جمعیت این باکتری مطالعه نشده است. Motsara، Bhattachryya و Srivastava برای تعیین جمعیت آزوسپیریلوم از روش MPN با استفاده از محیط RC استفاده کرده اند (۱۵).

تحقیقات بر روی تثبیت نیتروژن توسط آزوسپیریلوم به دفعات انجام شده است. ولی این تحقیقات معمولاً تنها روی یک گونه آزوسپیریلوم که اکثراً *A.brasilense* است، انجام شده است و به صورت مقایسه ای بین گونه های مختلف آزوسپیریلوم انجام نشده است، از طرفی بیان فعالیت نیتروژناز به صورت کمّی کمتر مورد توجه قرار گرفته و بیشتر چگونگی تثبیت ازت، ژنهای مؤثر بر روی تثبیت و تغییرات ژنتیکی بر روی این ژنها مورد ارزیابی قرارگرفته است(۱ ، ۱۰، ۱۱ ، ۲۰ ، ۲۱، ۲۲ و ۲۳).

با توجه به اهمیت آزوسپیریلوم در تثبیت ازت و همزیستی آن با گیاهان مختلف، هدف از انجام این تحقیق، جداسازی گونه های جنس آزوسپیریلوم از خاکهای جنگلی تهران، بررسی جمعیت گونه ای ومقایسه با کل جمعیت میکروبی و تعیین میزان تثبیت ازت توسط آنها بوده است.

مواد و روشها

جداسازی جنس آزوسپیریلوم و گونه های این جنس از خاک

نمونه برداری از خاکهای بکر و تحت پوشش گیاهی از مناطق پارک جنگلی چیتگر (پوشش گیاهی G1, G2, G3, G4, G5، بکر G6, G7, G8, G9, G10)، پارک جنگلی سوهانک (پوشش گیاهی S1, S2, S3, S4, S5، بکرS6, S7, S8, S9, S10)، پارک جنگلی توسکا (پوشش گیاهی T1, T2, T3, T4, T5، بکر T6, T7, T8, T9, T10) و پارک جنگلی سرخه حصار (پوشش گیاهی C1, C2, C3, C4, C5، بکر C6, C7, C8, C9, C10) انجام گرفت. جهت جداسازی نمونه باکتری

Archive of SID

www..SID.ir

مورد نظر، رقت سریال تهیه و در ویالهای حاوی ۵ ml محیط کشت نیمه جامد(nitrogen free malat – NFb) ریخته و با درپوش های پنبه ای آن ها را بسته و به مدت ۴۸-۴۰ ساعت در دمای بهینه ۳۷°C قرار داده شدند. پس از مدت زمان گرمخانه گذاری، پلیکل های تشکیل شده در نزدیک سطح به محیط نیمه جامد NFb انتقال داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت جامد NFb حاوی ۰/۰۲ g/L عصاره مخمر، تجدید کشت گردیدند. پس از تشکیل کلنی، مجددا" جهت غنی سازی به محیط کشت نیمه جامد NFb انتقال داده شدند.

جهت خالص سازی نمونه ها، از محیط کشت BMS آگار استفاده گردید. پس از کشت باکتریها بر روی این محیط و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت، کلنی های صورتی رنگ و چین خورده در روی محیط کشت جستجو شد. در مرحله دوم خالص سازی از محیط کشت (Rodriquez Caceres – RC) استفاده شد. کلنی های آزوسپیریلوم بر روی محیط کشت، قرمزرنگ، کوچک و ریز می باشند.

برای جداسازی در حد گونه از محیطهای کشت اختصاصی با منابع کربن مختلف استفاده شد. به این منظور از محیط کشت نیمه جامد NFb حاوی گلوکز، ساکارز، مانیتول و گلیسرول که جایگزین اسید مالیک می شوند، استفاده شد.

برای بررسیهای میکروسکوپی از لوله های مثبت و یا از کلنی های تیپیک، گستره میکروبی تهیه شد و در زیر میکروسکوپ نوری شکل ظاهری و سپس رنگ آمیزی گرم، تاژه و دانه های چربی مورد بررسی قرار گرفت.

برای تشخیص جنس وگونه های آزوسپیریلوم از تستهای بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز، ژلاتیناز، تولید اندول، اوره آز و نیترات زدایی استفاده شد.

با استفاده ازتست های مصرف گلوک، ساکارز، گلیسرول و مانیتول، شناسایی گونه ها به طوردقیق تر انجام گرفت.

بررسی جمعیت گونه های آزوسپیریلوم

برای بررسی جمعیت از روش MPN (most probable number) استفاده شد. با استفاده از این روش به طور تقریبی جمعیت جنس آزوسپیریلوم و حتی جمعیت گونه های آن بررسی شد. بررسی جمعیت به دو طریق زیر انجام شد:

استفاده از روشMPN با استفاده از محیط های جامد NFbآگار وRC

سری های رقت تهیه و به پلیت های حاوی ۱۵ ml از محیطهای plate count agar (برای شمارش کل باکترهای موجود)، NFb آگار (۵ محیط مختلف با منابع کربن اسیدمالیک، گلوکز، ساکاروز، مانیتول و گلیسرول) و RC (۵ محیط مختلف با منابع کربن اسیدمالیک، گلوکز، ساکاروز، مانیتول و گلیسرول) با دمای ۴۵ °C اضافه و پورپلیت گردید. نمونه ها در دمای ۳۷ °C و به مدت زمان ۴۸-۴۰ ساعت گرمخانه گذاری گردید و سپس تعداد کلنی های موجود شمارش شد.

استفاده از روشMPN با استفاده از محیط نیمه جامد NFb

سری های رقت تهیه و به لوله های موجود ۱۰ml از محیط استریل نیمه جامد NFb اضافه شدند. نمونه ها در دمای ۳۷ °C و به مدت زمان ۴۸-۴۰ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. سپس تعداد لوله هایی که تشکیل پلیکل داده بودند بررسی شدند.

بررسی توان تثبیت ازت (اندازه گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز)

از هر یک از گونه های جدا شده جنس آزوسپیریلوم یک لوپ به لوله های ۱۵ ml حاوی ۵ ml محیط کشت نیمه جامد Rennie تلقیح گردید و در انکوباتور با دمای ۳۸-۳۴ °C گرمخانه گذاری شدند، بعد از۴۸ ساعت در شرایط استریل درپوشهای پنبه ای با درپوشهای لاستیکی استریل جایگزین شده و پس ازاینکه ۱/۲ ml ازهوای داخل هر لوله کشیده شد، همان مقدار استیلن استاندارد به هر لوله تزریق شده گردید و برای ۲۴ ساعت درانکوباتور با دمای ذکر شده، گرمخانه گذاری شدند. سپس ۵ µ L از هوای داخل هر لوله با سرنگ کشیده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی ShimaDzu GC-14B با آشکار ساز شعله ای FID تزریق شد.

دمای تزریق ۱۱۰ °C، دمای ستون ۱۰۰ °C و دمای خروجی ۲۰ °C تنظیم گردید. در این دستگاه ماده ی پرکننده ستون شیشه ای حاوی سیلیکاژل است.

Archive of SID

www..SID.ir

میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز بر اساس مقدار تبدیل گاز استیلن به اتیلن تعیین گردید و با توجه به فرمول زیر میزان فعالیت نیتروژناز را بر حسب nmol/24Tube تعیین شد .

$$\text{فعالیت نیتروژناز} = \frac{\text{میزان اتیلن تولید شده (بر حسب نانو مول)}}{\text{زمان (بر حسب ساعت)}}$$

برای محاسبه ی میزان اتیلن تولید شده ابتدا منحنی استاندارد براساس میزان مشخصی از اتیلن تزریق شده به دستگاه رسم شد و با توجه به این نمودار معادله ی سطح زیر منحنی به دست آمد. با توجه به این معادله و بر اساس سطح زیر منحنی های به دست آمده، میزان حجم اتیلن تولیدی بر حسب میکرولیتر محاسبه گردید. از آنجا که تنها ۵ میکرولیتر از حجم به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شده بود و کل فضای موجود ۱ml بود، بنابراین میزان حجم اتیلن تولید شده هر نمونه را با یک نسبت ساده در ۱۰ ml به دست آورده و با توجه به اینکه حجم تمامی گازها در شرایط نرمال مساوی ۲۲/۴ لیتر است و با توجه به فرمول موجود میزان اتیلن تولیدی بر حسب نانو مول محاسبه گردید .

$$MOL = \frac{\text{حجم(برحسب لیتر)}}{\text{حجم نرمال}}$$

نتایج و بحث

نتایج حاصل از این تحقیق به عنوان یک مطالعه ی علمی مقدماتی نشان داد که از بین ۷ گونه ی *آزوسپیریلوم* معرفی شده در جهان تنها ۳ گونه در خاک های پارک های مورد مطالعه وجود داشت که این گونه های غالب شامل *A.lipoferum* ، *A.irakense* و *A.brasilense* بودند. با توجه به مطالعه ی مقایسه ای ۳ نوع محیط کشت برای جداسازی این گونه ها، مطالعه ی جاری نشان داد که در صورت استفاده از NFB نیمه جامد نتایج قابل استنادتر خواهد بود زیرا علاوه بر اینکه این محیط اختصاصی است، به دلیل تأمین شرایط نیمه هوازی توان تفکیک آزوسپیریلوم را از دیگر جنس های تثبیت کننده ازت که قادر به رشد در شرایط نیمه هوازی نیستند را نیز فراهم می آورد به طوری که جمعیت تعیین شده برای جنس آزوسپیریلوم در خاک جنگلی و بکر حدود سه واحد لگاریتمی با دو محیط RC, NFB جامد اختلاف نشان می دهد و از اینرو استفاده از محیط NFB نیمه جامد برای جداسازی گونه های آزوسپیریلوم قابل توصیه است (جدول۱ و ۲).

نتایج تحقیقات Pedrosa و همکاران (۱۹۸۴) و Baldani و همکاران (۱۹۸۶) نیز نشان می دهد که آزوسپیریلوم در شرایط نیمه هوازی نسبت به تثبیت ازت مبادرت می نماید از اینرو جداسازی این جنس در شرایط نیمه جامد NFB به دلیل تأمین این شرایط، محیط مناسبتری محسوب می گردد. با توجه به این نتایج و قرار دادن محیط NFB نیمه جامد به عنوان مبنای محاسبه ی جمعیت، جمعیت جنس آزوسپیریلوم در فصل بهار و زمان نمونه برداری در خاک با پوشش گیاهی $۹/۵\times۱۰^{۲}$ CFU/g بوده است که نشان دهنده ی جمعیت نسبتاً پائین این جنس از باکتری ها در خاک پارک های مورد مطالعه می باشد. البته این جمعیت حدود ۳ برابر جمعیت در خاک های بکر می باشد و نشانگر اثرات مثبت پوشش گیاهی و محیط ریزوسفری بر جمعیت این باکتری است.

جدول ۱. پراکنش جدایه ها در محیط نیمه جامد NFb

محیط کشت / مناطق نمونه برداری	محیط	NFb (اسید مالیک)	NFb (گلوکز)	NFb (گلیسرول)	NFb (ساکاروز)	NFb (مانیتول)
چیتگر	نمونه های جداشده	G1,G2,G4 G7,G8,G10	G1,G2,G5 G9,G8	G1,G4 G7,G10	G2,G4 G9,G8	G4,G5 G8
سوهانک	نمونه های جداشده	S1,S3,S4,S5 S7,S9,S10	S1,S3,S4 S8,S9	S1,S4,S5 S10	S4,S5 S9,S8, S7	S1,S2 S9
توسکا	نمونه های جداشده	T1,T2,T3,T5 T6,T9,T10,T7	T1,T2,T3,T7 T4,T9,T10	T2,T3,T4 T6,T7	T1,T3,T4 T10	T3,T4 T7.T10
سرخه حصار	نمونه های جداشده	C1,C3,C4,C5 C6,C8,C9,C10	C1,C3,C4 C7,C8,C9	C1,C3,C6 C8,C10	C1,C4 C5,C9	C3,C5 C9

Archive of SID

www..SID.ir

جدول ۲. توانایی تولید کلنی نمونهای برداشته شده ازمحیط نیمه جامد NFb ، روی محیط RC

محیط کشت / مناطق نمونه برداری	محیط	NFb (اسید مالیک)	NFb (گلوکز)	NFb (گلیسرول)	NFb (ساکاروز)	NFb (مانیتول)
چیتگر	نمونه های جداشده	G1,G4,G7 G8,G10	G2,G5 G9	G1,G7 G10	G2,G4 G8	G4,G5 G8,G10
سوهانک	نمونه های جداشده	S1,S3,S5 S9,S10	S1,S4 S7	S1,S5 S10	S4,S5 S7	S1,S9
توسکا	نمونه های جداشده	T1,T2,T6 T7,T9	T1,T2,T7 T4,T9	T2,T7 T6,T9	T1 T5	T7
سرخه حصار	نمونه های جداشده	C3,C4,C6 C8,C9,C10	C1,C3 C4,C8	C1,C3 C6,C10	C1,C4 C5,C9	C3,C5 C9

نتایج رنگ آمیزی گرم این باکتریها را گرم منفی، درشت، اندکی خمیده و میله ای شکل نشان داد. دانه های درون سلولی از جنس پلی بتا هیدروکسی بوتیرات PHB نیز در آنها مشاهده گردید. سلولهای *A. irakense* سلولها به صورت خمیده، میله ای شکل و S، سلولهای *A.brasilense* به شکل ویبروئیدی و سلولهای *A.lipoferum* به صورت خمیده و میله ای شکل دیده شدند. بر روی محیط BMS آگار بعد از۴۸-۴۰ ساعت در دمای C ° ۳۵-۳۳ کلنی های *A.brasilense* و*A.lipoferum* به رنگ صورتی، مات، نامنظم، و اغلب چروکیده و برآمده نمایان گردید. کلنی ها روی محیط BMS آگار لزج نبودند. کلنی های *A.irakense* روی محیط BMS نیمه شفاف، محدب و با حاشیه منظم مشاهده شدند. روی محیط RC بعد از۹۶ ساعت دردمای C ° ۳۵-۳۳ کلنی *A.brasilense*، *A.lipoferum* و *A.irakense* به صورت گرد، منظم، محدب و قرمز رنگ مشخص شد.

آزمونهای بیوشیمیایی نشان داد که جدایه های آزوسپیریلوم از لحاظ واکنش کاتالاز، ژلاتیناز و تولید اندول منفی ولی واکنش آنها درمقابل اکسیداز، اوره آز و نیترات زدایی مثبت هستند. تعیین جنس نمونه های جداشده از پارکهای جنگلی با توجه به نتایج آزمونهای بیوشیمیایی در جدول ۳ آورده شده است.

جدول۳. تعیین جنس نمونه های جداشده از پارکهای جنگلی

جدایه ها / پارک	*A.irakense*	*A.brasilense*	*A.lipoferum*
چیتگر	G2	G7	G10
سوهانک	S7	S10	S1
توسکا	T1	T6	T7
سرخه حصار	C4	C10, C6	C3

تعداد جمعیت کل باکتری های قابل شمارش با استفاده از محیط کشت ساده ی Plate count agar در نمونه های خاک پارکها مشخص گردید. با توجه به تستهای بیوشیمیایی به طور تقریبی جمعیت ۳ گونه غالب از آزوسپیریلوم در پارکها مشخص شد. از آنجا که براساس نوع قند مصرفی، گونه های جنس آزوسپیریلوم از همدیگر تفکیک می شوند و همه ی آنها قادرند از اسید مالیک استفاده نمایند از اینرو اسیدمالیک نشان دهنده ی تقریبی جمعیت کل گونه های آزوسپیریلوم است. ساکاروز نشان دهند ه ی تقریبی جمعیت گونه *A.irakense* و مانیتول نشان دهند ه ی تقریبی جمعیت گونه *A.lipoferum* است. باتوجه به این واقعیت تفاضل جمعیت کل از مجموع دو گونه *A.irakense* و *A.lipoferum* به عنوان جمعیت *A.brasilense* در نظر گرفته شد (جدول ۴ و ۵).

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که با استفاده از محیط نیمه جامد NFb جمعیت آزوسپیریلوم را می توان با دقت بیشتری تعیین کرد زیرا این محیط برای جنس آزوسپیریلوم اختصاصی است و می تواند باکتریهای تثبیت کننده ازت را جداسازی کند، ازطرفی مزیت دیگر آن این است که می تواند از میان باکتریهای تثبیت کننده ازت نیز، باکتریهایی که در شرایط

Archive of SID

www..SID.ir

میکروآئروفیلیک تثبیت کنندگی دارند را جدا کند و درصد خطا را کاهش دهد.

جدول ۴. جمعیت گونه های آزوسپیریلوم در پارکهای جنگلی (جمعیت دریک گرم خاکCFU/g)

جمعیت	محیط	جمعیت در کل پارکهای جنگلی تهران (دریک گرم از خاک)	
		پوشش گیاهی	بکر
جمعیت کل جنس *آزوسپیریلوم*	NFb	$۴/۳\times۱۰^{۵}$	$۱/۴۳\times۱۰^{۵}$
	RC	$۱/۹۱\times۱۰^{۵}$	$۰/۷۷\times۱۰^{۵}$
	NFbنیمه جامد	$۹/۵\times۱۰^{۲}$	$۲/۷\times۱۰^{۲}$
A.brasilense	NFb	$۱/۲۱\times۱۰^{۵}$	$۴/۵\times۱۰^{۴}$
	RC	$۰/۶۰\times۱۰^{۵}$	$۱/۳۶\times۱۰^{۴}$
	NFbنیمه جامد	$۶/۶\times۱۰^{۲}$	$۰/۹\times۱۰^{۲}$
A.lipoferum	NFb	$۸/۷\times۱۰^{۴}$	$۴/۵\times۱۰^{۴}$
	RC	$۶/۵\times۱۰^{۴}$	$۰/۴۰\times۱۰^{۵}$
	NFbنیمه جامد	$۲/۶\times۱۰^{۲}$	$۹/۵\times۱۰^{۱}$
A.irakense	NFb	$۷/۱\times۱۰^{۴}$	$۵/۵\times۱۰^{۴}$
	RC	$۵/۶۱\times۱۰^{۴}$	$۳/۱\times۱۰^{۴}$
	NFbنیمه جامد	$۲/۴\times۱۰^{۲}$	$۸/۵\times۱۰^{۱}$
کل جمعیت میکروبی خاک	Plate count agar	$۱/۹۱\times۱۰^{۱۰}$	$۶/۲\times۱۰^{۹}$

جدول ۵. بررسی گونه غالب آزوسپیریلوم در پارکهای جنگلی تهران

محیط کشت	NFb نیمه جامد		NFb آگار		RC	
منطقه نمونه برداری	پوشش گیاهی	بکر	پوشش گیاهی	بکر	پوشش گیاهی	بکر
گونه غالب	*A.brasilense*	*A.lipoferum*	*A.brasilense*	*A.irakense*	*A.lipoferum*	*A.lipoferum*

میزان فعالیت نیتروژناز نمونه ها جدول ۶ و ۷ آورده شده است. میزان تثبیت ازت در *A.lipoferum* از دو گونه دیگر بیشتر بوده و برابر $۸۶/۲۷\frac{nmol}{24hTube}$ است و این میزان در *A.irakense* از همه کمتر و برابر $۲۳/۹۲\frac{nmol}{24hTube}$ است ودر گونه *A.brasilense* برابر $۵۶/۴\frac{nmol}{24hTube}$ است که این نتایج در نمودار ۲ نشان داده شده است.

جدول۶. بررسی میزان تثبیت ازت گونه های آزوسپیریلوم

نمونه	زمان خروج اتیلن (min)	زمان خروج استیلن (min)	ارتفاع منحنی اتیلن (uV)	ارتفاع منحنی استیلن (uV)	سطحز یر منحنیا تیلن	سطح زیر منحنی استیلن	کل سطح زیر منحنی	حجم اتیلن تولید شده در ۵µL بر حسب میکرولیتر)	حجم اتیلن تولید شده در ۱۰ml بر حسب میکرولیتر	میزان اتیلن تولید شده برحسب نانومول	میزان فعالیت نیتروژناز برحسب $\frac{nmol}{24hTube}$
G2	۲/۵۰۲	۳/۷۲۲	۲۶۳	۱۱۶۰۹	۲۵۹۷	۱۸۵۶۶۱	۱۸۸۲۵۸	۰/۰۰۷	۱۴	۶۲۰	۲۵/۸
G7	۲/۵۱۳	۳/۷۳۴	۹۸۲	۱۶۵۸۱	۱۰۲۰۰	۲۶۱۵۷۸	۲۷۱۷۷۸	۰/۰۱۹	۳۸	۱۶۹۰	۷۰/۴۱
G10	۲/۴۶۵	۳/۶۸۸	۲۰۱۹	۱۹۷۸۱	۱۹۳۸۵	۲۷۹۰۱۷	۲۹۸۴۰۱	۰/۰۱۸	۳۶	۱۶۰۰	۶۶/۶
S1	۲/۴۹۴	۳/۷۱۱	۲۱۳۶	۲۰۰۳۵	۱۹۶۲۲	۲۶۰۶۳۳	۲۸۰۲۸۲	۰/۰۳۴	۶۸	۳۰۳۰	۱۲۶/۲۵
S7	۲/۴۹۱	۳/۷۱۳	۳۲۱	۲۰۴۷۵	۲۷۶۷	۳۰۶۳۸۷	۳۰۹۱۹۵	۰/۰۰۷	۱۴	۶۲۰	۲۵/۸
S10	۲/۵۱۹	۳/۷۴	۶۲۴	۱۵۸۰۵	۷۰۳۲	۲۸۳۸۸۲	۲۹۰۹۱۴	۰/۰۱۴	۲۸	۱۲۵۰	۵۲/۰۸
T1	۲/۵۰۳	۳/۷۲۷	۳۲۱	۱۹۵۷۱	۲۷۶۷	۲۶۲۳۲۹	۲۶۵۰۹۶	۰/۰۰۷	۱۴	۶۲۰	۲۵/۸
T6	۲/۴۸۷	۳/۷۱۲	۴۳۴	۱۷۷۳۴	۶۳۵۷	۲۵۳۴۹۱	۲۵۹۸۴۹	۰/۰۱۳	۲۶	۱۱۶۰	۴۸/۳
T7	۲/۴۹	۳/۷۱۲	۱۶۷۸	۱۸۸۹۲	۱۵۸۲۳	۲۵۰۶۹۷	۲۶۶۸۰۰	۰/۰۲۸	۵۶	۲۵۰۰	۱۰۴/۱۶
C3	۲/۵۴۴	۳/۷۷۲	۴۸۴	۴۲۵۵	۶۷۶۲	۸۷۴۶۶	۹۴۲۲۷	۰/۰۱۴	۲۸	۱۲۵۰	۵۲/۰۸
C4	۲/۳۵۶	۳/۷۵۹	۱۰۷	۳۱۵۹	۱۲۵۲	۶۴۸۴۸	۶۶۱۰۰	۰/۰۰۵	۱۰	۴۴۰	۱۸/۳
C6	۲/۴۸۸	۳/۷۰۷	۱۰۰۲	۱۶۱۳۱	۸۵۸۰	۲۰۹۵۰۲	۲۱۸۰۹۸	۰/۰۱۷	۳۴	۱۵۱۰	۶۲/۹۱
C10	۲/۵۳۵	۳/۷۵۸	۴۳۴	۱۶۱۳۱	۶۳۵۷	۲۰۹۵۰۲	۲۱۵۸۵۹	۰/۰۱۳	۲۶	۱۱۶۰	۴۸/۳

Archive of SID

www..SID.ir

با توجه به داده های بالا و نوع گونه های *A.brasilense* G7 ، *A.irakense* G2 *A.lipoferum* S1 ، *A.lipoferum* G10 *A.brasilense* S10 ، *A.irakense* S7 *A.brasilense* T6 ، *A.irakense* T1 *A.lipoferum* C3 ، *A.lipoferum* T7 *A.brasilense* C10, C6و *A.irakense* C4 مشخص گردید که میزان تثبیت در گونه های مشابه به صورت تقریبی به هم نزدیک بوده است. میانگین فعالیت نیتروژنازی هر گونه در جدول شماره ی ۷ آورده شده است.

جدول۷. میانگین تثبیت ازت گونه های آزوسپیریلوم جدا شده

گونه	نمونه	میزان فعالیت نیتروژناز(برحسب $\frac{nmol}{24hTube}$)	نمونه DSMZ
A.irakense	G2	۲۳/۹۲	۲۴/۲
	S7		
	C4		
	T1		
A.brasilense	G7	۵۶/۴	۵۷
	S10		
	T6		
	C6		
	C10		
A.lipoferum	G10	۸۶/۲۷	۸۵/۸
	S1		
	T7		
	C3		

نتایج این تحقیق نشان داد که جمعیت ۳ گونه ی غالب بسیار نزدیک به هم بوده و حدود ۱۰۰ سلول در هر گرم خاک می باشد و نشانگر توانایی این ۳ گونه در سازگاری با شرایط رطوبتی، شیمیایی و فیزیکی خاک های مورد مطالعه می باشد. البته ممکن است که مطالعات بیشتر وجود گونه های دیگری را غیر از آنچه که تا حال در جهان معرفی شده اند را ثابت کند به طوری که در این مطالعه تعدادی ایزوله که تست های شیمیایی آنها با گونه های معرفی شده متفاوت بود، نیز مشاهده گردید.

شاید این مطالعه دلیل استفاده از ۳ گونه ی مذکور در غالب کودهای بیولوژیک جهان و ایران باشد. به طوری که گونه ی*A.lipoferum* در مایه تلقیحی تجارتی شرکت طبیعت گرا و گونه های *A.lipoferum* و *A.brasilense* در محصولات تجارتی شرکت مهر آسیا وجود دارد و علت استفاده از این گونه ها به علت اثرات مثبت متعدد و توانمندی های افزاینده رشدی به دلیل سازگاری آنها برای خاک های کشور می باشد. همچنانکه این تحقیق نشان داد گونه ی *A.lipoferum* از نظر تثبیت ازت در مرتبه ی اول قرار دارد و به همین دلیل است که شرکت های فوق الذکر این گونه را جزء انتخاب اول خود در ترکیب مایه تلقیح های تجارتی قرار داده اند.

بر اساس مطالعات Kaiser و همکاران (۱۹۹۱) گونه ی *A.irakense* یک گونه مقاوم به شوری معرفی شده است و اولین بار از خاک های شور عراق جداسازی شده است. جداسازی این گونه از خاک پارک های جنگلی نشان می دهد که اگرچه این گونه توان تثبیت ازت پائین تری در مقایسه با دو گونه ی دیگر دارد ولی به دلیل توان مقاومت در برابر شوری، در خاک های شور به عنوان ترکیب اصلی کودهای بیولوژیک قابل استفاده می باشد، مخصوصاً که اغلب خاک های کشور را خاک های شور و قلیا تشکیل می دهد.

اگرچه اغلب در محیط های کشت از مواد ساده و تولیدات جانبی کارخانجات استفاده می گردد ولی مصرف ساکاروز به عنوان یک منبع قند ساده یک مزیت محسوب می گردد از اینرو یکی از دلایل استفاده از گونه ی *A.lipoferum* ، علاوه بر اثرات افزایندگی رشد و تثبیت ازت بیشتر، به دلیل ارزانی محیط کشت مورد استفاده در تکثیر این گونه به عنوان ترکیب اصلی مایه تلقیح های تجارتی مورد استفاده در کشور می باشد.

Archive of SID

www..SID.ir

منابع

۱- خاوازی، ک.، اسدی رحمانی، ه .،۱۳۸۴، ضرورت تولید کودهای بیولوژیک درکشور، نشر آموزش کشاورزی

2- Arsène F; Kaminski PA; Elmerich C, (1999). Control of Azospirillum brasilense NifA activity by P (II): effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity.FEMS Microbiol Lett. **179**(2): 339-343.

3- Baldani V. L. D; Baldani J. I; Döbereiner J, (1986). Effects of Azospirillum inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. Can J Microbiol. **29**: 924–929.

4- Bashan Y; Holguin G, (1997). Azospirillum - plant relationships. environmental and physiological advances. Can. J. Microbiol. **43**: 103-121.

5- Bashan Y; Levanony H, (1990). Current status of Azospirillum inoculation technology. Azospirillum as a challenge for agiculture.Can. J. Microbiol. **36**: 591–608.

6- Ben Dekhil S; Cahill M; Stackebrandt E; Sly L. I, (1997). Transfer of Conglomeromonas largomobilis subsp. largomobilis to the genus Azospirillum as Azospirillum largomobile comb. nov., and elevation of Conglomeromonas largomobilis subsp. parooensis to the new type species of Conglomeromonas, Conglomeromonas parooensis. sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. **20**: 72-77

7- Berge A. C. P; Tarrand K; Dobberefner T; Lindeque D; Bshan Y; Lvenonv H; Boembeg G.V, (2005). Azospirillum. **2** : 7-28.

8- Berge A. C; Tarrand P; Dobberefner K;Lindeque D. A;Moore; Sischo W. M, (2003). Azospirillum. **1** : 1142 - 1149.

9- Döbereiner J, (1992). The genera Azospirillum and Herbaspirillum. In The Prokaryotes **3**: 2236–2253. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. Berlin. Springer

10- Eckert B; Weber O. B; Kirchhof G; Halbritter A; Stoffels M; Hartmann A, (2001). Azospirillum doebereineraeAzospirillum doebereinerae sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-gass MiscanthusMiscanthus. Int. J. Syst. E vol. Microbiol. **51**: 17-26.

11- Ishida ML; Assumpção MC; Machado HB; Benelli EM; Souza EM; Pedrosa FO, (2002). Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in Azospirillum brasilense. Braz J Med Biol Res. **35**(6): 651-661.

12- Kapulnik Y; Okon Y; Kigel J; Nur I; Henis Y, (1981). Effects of Temperature, Nitrogen Fertilization, and Plant Age on Nitrogen Fixation by Setaria italica Inoculated with Azospirillum brasilense (strain cd). Plant Physiology. **68**(2): 340–343.

13- Khammas K. M; Ageron E; Gimont P. A. D; Kaiser P, (1989). Azospirillum irakense sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. **140**: 679–693.

14- Kennedy I. R; Islam N, (2001). The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms, PP. a review. Aust. J. Exp. Agic. **41**: 447– 457.

15- Magalhães F. M; Baldani J. I; Souto S. M; Kuykendall J. R; Döbereine J, (1983). A new acid-tolerant Azospirillum species. An. Acad. Brasil. Cienc. **55**: 417-430.

16- Motsara M. R; Bhattacharyya P; Srivastava B, (1995). Biofertiliser,Technology ,Marketing and Usage. 118-123.

17- Pedrosa F. O; Yates M. G, (1984). Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of Azospirillum brasilense by nifA and ntrC (glnG) type genes. FEMS Microbiol. Lett. **55**: 95-101

18- Peng G; Wang H; Zhang G; Hou W; Liu Y; Wang E.T; Tan Z, (2006). Azospirillum melinis sp. nov., a goup of diazotrophs isolated from tropical molasses gass. Int. J. Syst. Microbiol., **56**: 1263-1271.

19- Reinhold B; Hurek T; Fendrik I; Pot B; Gillis M; Kersters K; Thielmans D; Deley J, (1987). Azospirillum halopraeferans Azospirillum halopraeferans sp. nov., a nitrogen - fixing organism associated with roots of

Archive of SID

www..SID.ir

kallar gass (Leptochloa fusca Leptochloa fusca). Int. J. Syst. Bacteriol. **37**: 43-51.

20- Rennie R. J, (1980).Asingle medium for the isolation of accetylen –reducing (dintrogen-fixing) Bacteria from soils. Agiculture Canada. **7**: 9-11

21- Revers LF; Passaglia LM; Marchal K; Frazzon J; Blaha CG; Vanderleyden J; Schrank IS, (2000). Characterization of an Azospirillum brasilense Tn5 mutant with enhanced N(2) fixation: the effect of ORF280 on nifH expression. FEMS Microbiol Lett. **183**(1):23-29

22- Smith R. L; Schank S. C; Milam J. R; Baltensperger AA, (1984). Responses of Sorghum and Pennisetum Species to the N (2)-Fixing Bacterium Azospirillum brasilense.Appl Eveiron Microbiol. **47**(6): 1331-1336.

23- Sun J; Peng X; Van Impe J; Vanderleyden; J, (2000). The ntrB and ntrC genes are involved in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in Azospirillum brasilense Sp7.Appl Environ Microbiol. **66**(1): 113-117.

24- Zhang Y; Burris RH; Ludden PW; Roberts GP, (1997). Regulation of nitrogen fixation in Azospirillum brasilense.FEMS Microbiol Lett. **152**(2): 195-204.

25- Xie C.H; Yokota A, (2005). Azospirillum oryzae sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant Oryza sativa. Int. J. Syst. Microbiol., **55**: 1435-1438.

Archive of SID

www..SID.ir