



## ارزیابی صفات محرک رشدی برخی از جدایه‌های باکتری از توباکتر بومی خاک‌های استان گلستان

\*افشین بهروز<sup>۱</sup>، محسن علمائی<sup>۲</sup>، سیدعلیرضا موحدی نائینی<sup>۲</sup> و رضا قربانی نصرآبادی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، <sup>۲</sup>دانشیار گروه علوم خاک،

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، <sup>۳</sup>استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱

### چکیده

**سابقه و هدف:** طی چند دهه اخیر تلاش برای افزایش تولید در واحد سطح، مصرف زیاد و نامتعادل کودهای شیمیایی پیامد تخریب محیط زیست را به همراه داشته است. مصرف کودهای زیستی بدون نگرانی از اثرات سوء زیست‌محیطی با تأمین بخشی از نیاز گیاه به عناصر غذایی موجب بهبود شرایط فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک می‌شود. یکی از ریزموجودات خاکزی که توانایی تحریک رشد گیاهان زراعی را دارد باکتری‌های جنس از توباکتر می‌باشد. این باکتری به‌طور مستقیم و غیرمستقیم پارامترهای رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این پژوهش با هدف جمع‌آوری جدایه‌های مختلف از توباکتر در سطح استان گلستان، بررسی خصوصیات محرک رشد آن و شناسایی جدایه‌های برتر انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** خصوصیات محرک رشد از جمله تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی به روش احیاء استیلن، حلالیت کمی فسفر در محیط کشت اسپریر به روش رنگ‌سنجی با دستگاه اسپکتوفتومتر، حلالیت کمی پتاسیم معدنی در محیط کشت الکساندروف با دستگاه فلم‌فتومتر، تولید هورمون اکسین در محیط کشت ال بی تریپتوفان به روش رنگ‌سنجی با دستگاه اسپکتوفتومتر، توانایی تولید نیمه‌کمی سیدروفور بر روی محیط CAS-Agar و توانایی تولید هیدروژن سیانید بر روی محیط TSA اندازه‌گیری شد. داده‌های به‌دست آمده از هر بخش به کمک نرم‌افزار SAS با استفاده از طرح آماری کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسات میانگین به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

**یافته‌ها:** ۴۳ جدایه از توباکتر از خاک‌های سطح استان جداسازی شد. نتایج نشان داد که بیش‌ترین مقدار تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی برای جدایه شماره ۳ برابر با ۲۷۶ نانومول بر ساعت در لوله، بیش‌ترین توان حلالیت کمی فسفر برای جدایه شماره ۲۵ برابر با ۲۳۲ میلی‌گرم در لیتر، بیش‌ترین توان حلالیت کمی پتاسیم معدنی برای جدایه شماره ۲۳ برابر با ۴۷ میلی‌گرم در لیتر، بیش‌ترین توان تولید هورمون اکسین برای جدایه شماره ۳۷ برابر با ۹۸ میلی‌گرم در لیتر و بیش‌ترین نسبت قطر هاله به کلنی در اندازه‌گیری توان تولید نیمه‌کمی سیدروفور مربوط به جدایه‌های شماره ۴، ۹، ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۷، ۳۸، ۴۰، ۴۱ و ۴۳ بوده است. توانایی تولید هیدروژن سیانید هم اندازه‌گیری شد، در بین تمامی جدایه‌ها فقط ۴ جدایه دارای این توانایی بودند و بیش‌ترین میزان تولید هیدروژن سیانید مربوط به جدایه شماره ۴۳ می‌باشد.

\* مسئول مکاتبه: [afshinbehrooz1989@yahoo.com](mailto:afshinbehrooz1989@yahoo.com)

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که جدایه‌های ازتوباکتر جداسازی شده از خاک‌های استان گلستان دارای توانمندی‌های متفاوتی از نظر ویژگی‌های محرک رشدی بوده و بیش‌ترین مقادیر تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفات و پتاسیم، توانایی تولید سیدروفور و اکسین در جدایه‌های مختلفی به دست آمد. با توجه به نتایج به دست آمده در جدایه‌های مختلف ازتوباکتر، به نظر می‌رسد برخی از جدایه‌ها قابلیت استفاده به‌عنوان محرک رشد گیاه را دارا می‌باشند.

**واژه‌های کلیدی:** ازتوباکتر، محرک‌های رشد، تثبیت زیستی نیتروژن

### مقدمه

با توجه به افزایش رو به رشد جمعیت جهان و همراه با آن افزایش تقاضای انرژی (با توجه به کاهش قابل توجه ذخایر انرژی کره زمین نظیر سوخت‌های فسیلی)، امنیت غذایی کشورهای مختلف و به‌خصوص کشورهای در حال توسعه تحت تأثیر قرار گرفته و در نتیجه فشار بر محیط زیست جهت تأمین غذای مورد نیاز را دو چندان می‌کند (۵).

طی چند دهه اخیر تلاش برای افزایش تولید در واحد سطح پیامدهایی از جمله مصرف زیاد و نامتعادل کودهای شیمیایی را به همراه داشته است که علاوه بر افزایش هزینه تولید اثرات زیست‌محیطی مخربی را به همراه دارد، بنابراین، وجود این قبیل اثرات مخرب و بسیاری مسائل دیگر ضرورت تجدیدنظر در شیوه‌های افزایش تولید محصول را گوشزد می‌کند. مصرف کودهای زیستی بدون نگرانی از اثرات سوء زیست‌محیطی غالباً موجب بهبود شرایط فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک‌ها شده و افزایش حاصلخیزی و باروری اراضی را به دنبال دارند. علاوه بر این، کاربرد روش‌های زیستی برای تولید بیش‌تر می‌تواند باعث بهبود شاخص‌های کیفیت خاک و در نهایت کشاورزی پایدار، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک شود. یکی از ریزموجوداتی که می‌توان در تهیه کودهای زیستی استفاده کرد باکتری از جنس

*ازتوباکتر* می‌باشد (۶). جنس *ازتوباکتر* نیتروژن مولکولی موجود در اتمسفر را به‌صورت آزادزی تثبیت و وارد خاک می‌کند. این باکتری از جمله مهم‌ترین دی‌آزوتروف‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی به حساب می‌آید که در سال‌های اخیر توجه پژوهشگران کشور را به خود جلب کرده است. به‌علاوه مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان داد که گونه‌های مختلف این باکتری را می‌توان در زمره انواع ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه قرارداد. ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، گروه وسیعی از باکتری‌های خاک‌زی هستند. این باکتری‌ها به دو صورت «مستقیم» یعنی تحریک رشد گیاه از طریق مکانیسم‌های تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مانند تولید هورمون‌های گیاهی، حل‌کنندگی فسفات، تسریع فرآیند معدنی‌شدن و یا «غیرمستقیم» یعنی کنترل عوامل بیماری‌زا از طریق تولید ترکیبات مختلف مانند سیانید، سیدروفور، متابولیت‌های ضدقارچ و آنتی‌بیوتیک‌ها به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند (۲۶، ۱۶).

باکتری جنس *ازتوباکتر* مستقیماً و به‌واسطه تثبیت نیتروژن مولکولی، افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصر غذایی و خصوصاً تولید هورمون‌های گیاهی (مانند اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و غیره) موجب بهبود شرایط تغذیه و رشد گیاه می‌شوند. این باکتری

سوسپانسیون به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت انتخابی وینوگراسکی مایع فاقد نیتروژن اضافه شد. محیط وینوگراسکی شامل ۵۰ میلی‌لیتر محلول غلیظ وینوگراسکی که بر حسب گرم در لیتر شامل: (۵/۰  $K_2HPO_4$ ، ۲/۵  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۲/۵  $NaCl$ ، ۰/۰۵  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ،  $pH=7/3$ ، ۰/۰۵  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ )، ۱ میلی‌لیتر محلول عناصر کم‌مصرف بر حسب گرم در لیتر شامل: (۰/۰۵  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ، ۰/۰۵  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۰/۰۵  $ZnSO_4$ ، ۰/۰۵  $K_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ )، ۱۰ گرم مانتول، ۰/۵ گرم کربنات کلسیم و ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر است. این سوسپانسیون جدید به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس از این سوسپانسیون دارای کدورت رقت سازی تا رقت  $10^{-12}$  در سرم فیزیولوژیک (محلول ۰/۹ درصد  $NaCl$ ) انجام گرفت و از رقت‌های مختلف بر روی محیط کشت وینوگراسکی جامد به‌منظور خالص‌سازی کشت داده و پس از چند مرحله واکشت کلنی‌های تپیک بر روی محیط کشت انتخابی وینوگراسکی انتخاب و جدایه‌ها از نظر وجود سایر باکتری‌ها خالص‌سازی شدند و پس از انجام بررسی میکروسکوپی و مشاهده سلول‌های درشت کروی محدب که در کشت کهنه تشکیل سیستم زرد، قهوه‌ای تا مایل به سیاه می‌دهند و انجام تست‌های بیوشیمیایی مختلف که شامل آزمون گرم، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز و آزمون تولید اسید از قند تعداد ۴۳ جدایه به‌عنوان ازتوباکتر شناسایی شدند (۹).

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 (۷، ۱۳). ازتوباکتر توانایی تولید سیدروفورهای مختلف و افزایش قابلیت جذب و تحرک عناصری همچون آهن، روی و مولیبدن را دارا می‌باشد (۱۳، ۱۴) و در شرایط نامساعد محیطی از جمله خشکی، کمبود مواد آلی و عناصر غذایی به حالت سیست در می‌آید (۲۵).

هدف این پژوهش جداسازی جدایه‌های مختلف ازتوباکتر از خاک‌های استان و برآورد توانایی تحریک‌کنندگی رشد این جدایه‌ها و انتخاب بهترین جدایه برای تهیه مایه تلقیح از آن می‌باشد که با نیل به این هدف می‌توان سبب افزایش اثر بخشی بهتر کودهای زیستی در استفاده در گیاهان مختلف شد.

### مواد و روش‌ها

**جداسازی باکتری ازتوباکتر:** جهت جداسازی جدایه‌های ازتوباکتر بومی استان گلستان، نمونه‌برداری از خاک این استان انجام گرفت و ۱۵ نمونه خاک از مزارع و باغات سطح استان جهت خالص‌سازی باکتری به آزمایشگاه بیولوژی گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید و سریعاً مراحل جداسازی باکتری ازتوباکتر روی محیط‌های انتخابی وینوگراسکی انجام پذیرفت. از هر نمونه خاک یک گرم به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب شهر استریل در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه و یک ساعت روی شیکر قرار داده شد، سپس ۱ میلی‌لیتر از این

جدول ۱- تست‌های انجام شده جهت شناسایی باکتری‌های ازتوباکتر.

Table 1. The performed tests for identification *Azotobacter* bacteria.

باکتری ازتوباکتر <i>Azotobacter</i> bacteria	تست‌های انجام شده The performed tests
با اینکه این محیط فاقد نیتروژن است باکتری رشد می‌کند The medium has not nitrogen, though the bacteria grows	محیط کشت وینوگراسکی Vinogradsky medium
تشکیل سیست به رنگ زرد و قهوه‌ای تا مایل به سیاه Formation yellow and brown cyst to blackish	کشت کهنه Old culture
گرم منفی Negative- gram	آزمون گرم Gram test
توانایی تولید آنزیم سیتوکروم اکسیداز به صورت تغییر رنگ کلنی به بنفش تیره در اثر تماس با معرف Ability of producing cytochrome oxidase enzyme as colony color change into dark violet affected cowax reagent	آزمون اکسیداز Oxidase test
کوواکس Ability of producing cytochrome oxidase enzyme as colony color change into dark violet affected cowax reagent	آزمون کاتالاز Catalase test
دارای آنزیم کاتالاز و تشکیل حباب توسط محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن With catalase enzyme and formation bubble by hydrogen peroxide %3 solution	آزمون تولید اسید از قند Producing acid from sugar test
دارای توانایی تولید اسید از قند و تغییر رنگ معرف برموتیمول بلو از آبی به زرد در محیط With ability of Producing acid from sugar and color change of bromothymol blue reagent in medium from blue into yellow	

دستگاه کروماتوگرافی گازی (GOW\_MAC) تزریق گردید و سطح زیر منحنی ایجاد شده قرائت شد. البته قبل از قرائت نمونه‌های باکتری، دستگاه با غلظت‌های مختلف اتیلن کالیبره و منحنی کالیبراسیون رسم گردید (۱۷).

اندازه‌گیری کمی توان حل فسفات معدنی: قبل از انجام آزمایش، ارلن‌ها و تمام وسایل شیشه‌ای مورد نیاز با آب دی‌یونیزه شسته شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد داخل آون قرار داده شدند. از کشت تازه باکتری به وسیله لوپ فلزی کلونی باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط وینوگراسکی مایع تلقیح و پس از سپری شدن ۴۸ ساعت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تازه میکروبی به ۲۵ میلی‌لیتر محیط اسپربر (که بر حسب گرم در لیتر شامل: ۱۰/۲، Yeast extract ۰/۵، CaCl<sub>2</sub> ۰/۱، Glucose ۰/۲، MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ۵، Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> افزوده و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۲ میلی‌لیتر از

اندازه‌گیری کمی توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی: به منظور بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکول از روش احیاء استیلن (ARA)<sup>۱</sup> و دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC)<sup>۲</sup> استفاده شد. در ابتدا در درون لوله‌های آزمایش در پوش دار ۱۵ میلی‌لیتری مقدار ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع فاقد نیتروژن وینوگراسکی ریخته و استریل گردید. پس از سرد شدن کامل محیط و رسیدن آن به دمای مطلوب رشد باکتری ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی تازه به هر لوله اضافه گردید، پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، درب پنبه‌ای لوله‌ها با درب‌های پلاستیکی استریل تعویض شد و ۱۰ درصد حجم هوای داخل هر لوله (۰/۷ میلی‌لیتر بدون احتساب حجم لاستیک) به وسیله سرنگ تخلیه و به همان میزان گاز استیلن به لوله‌ها تزریق گردید. درزهای درپوش‌های لاستیکی با پارافیلیم پوشانده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدد ۰/۷ میکرولیتر از هوای داخل لوله با استفاده از سرنگ هامیلتون به

- 1- Acetylene reduction assay
- 2- Gas chromatography

اکسین محیط کشت مایع LB-T<sup>۱</sup> که دارای ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر L-Tryptophan به عنوان پیش ماده تولید اکسین (بر حسب گرم در لیتر شامل: ۱۰ Yeast Extract، ۵ NaCl، ۵ Trypton) است، تهیه و به مقدار ۲۵ میلی لیتر در درون ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری توزیع و استریل گردید و ۱ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی تازه به درون هر ارلن تلقیح گردید. درب ارلن ها با پنبه استریل و فویل آلومینیومی استریل مسدود و جداره بیرونی ارلن ها با نایلون سیاه رنگ پوشانده شده (به این دلیل که از تجزیه اکسین تولیدی بر اثر تابش نور جلوگیری شود) و بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در زمان های ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون های درون هر ارلن برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول شفاف رویی به آرامی جدا و یک میلی لیتر از این محلول به ۲ میلی لیتر معرف سالکوسکی (شامل ۹۸ میلی لیتر اسیدپرکلریک ۳۵٪، ۲ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) افزوده شد. نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند و در نهایت شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار اکسین تولیدی با مقایسه شدت جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از اسید ایندول استیک محاسبه شد. برای رسم منحنی استاندارد اکسین، غلظت های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر IAA تهیه و یک حجم از این محلول با دو حجم از معرف سالکوسکی مخلوط و خوب به هم خورده شد. پس از ۲۰ دقیقه در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت انجام شد (۱۹).

سوسپانسیون داخل اپندورف ریخته شد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و ۱ میلی لیتر از محلول بالایی با ۱ میلی لیتر معرف آمونیم مولیبدات وانادات و ۳ میلی لیتر آب دی یونیزه مخلوط گردید. نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفته و سپس مقدار جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده توسط مقادیر مختلف KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> محاسبه گردید. برای ترسیم منحنی استاندارد ۱ میلی لیتر از غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی گرم در لیتر KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> با ۳ میلی لیتر آب دی یونیزه و ۱ میلی لیتر معرف آمونیم مولیبدات-وانادات مخلوط و سپس میزان جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد (۱۱).

**اندازه گیری کمی حلالیت پتاسیم معدنی:** از کشت تازه باکتری به وسیله لوپ فلزی کلونی باکتری، به ۲۵ میلی لیتر محیط وینوگرادسکی مایع تلقیح و پس از سپری شدن ۴۸ ساعت یک میلی لیتر از سوسپانسیون تازه میکروبی به ۲۵ میلی لیتر محیط الکساندروف (این محیط بر حسب گرم در لیتر شامل: ۵ Sucrose، ۰/۵ MgSO<sub>4</sub>، ۰/۱ CaCO<sub>3</sub>، ۰/۰۵ FeCl<sub>3</sub>، ۰/۰۲ H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>، ۵ Muscovite، pH=۷) افزوده و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در زمان های ۷۲ و ۹۶ ساعت، ۱۵ میلی لیتر از سوسپانسیون با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و در محلول رویی آن به وسیله دستگاه شعله سنج (فلم فتومتر) غلظت پتاسیم اندازه گیری شد (۲۰).

**اندازه گیری کمی توان تولید هورمون اکسین (IAA):** برای اندازه گیری کمی توانایی تولید هورمون

1- LB-Tryptophan (Luria-Bertani)

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده از هر بخش به کمک نرم‌افزار SAS با استفاده از طرح آماری کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسات میانگین به روش LSD در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در جدول ۲ آورده شده است:

**اندازه‌گیری کمی توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی:**  
خروج گاز اتیلن از دستگاه در مدت زمان ۷/۵ دقیقه و گاز استیلن در مدت زمان ۸/۶ دقیقه صورت گرفت. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، مقادیر نیتروژن مولکولی تولید شده در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین مقدار نیتروژن مولکولی تولید شده در جدول ۳ نشان داده شده است. بیش‌ترین مقدار نیتروژن تولید شده در مدت زمان ۲۴ ساعت مربوط به جدایه ۳ با ۲۷۶ نامول اتیلن تولید شده در ساعت در لوله می‌باشد. که این مقدار نشان‌دهنده توانایی بالای این جدایه در تثبیت نیتروژن مولکولی می‌باشد. در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی انتظار می‌رفت که تمامی جدایه‌ها باعث احیاء استیلن به اتیلن شوند؛ اما تعدادی از جدایه‌ها پتانسیل تثبیت را از خود بروز ندادند، این در حالی بود که تمامی جدایه‌های ازتوباکتر در یک محیط فاقد منبع نیتروژن نیتراتی و آمونیومی قادر به رشد بودند. قابلیت تثبیت نیتروژن مولکولی در ازتوباکتر ثابت شده و این باکتری از دیرباز به‌عنوان یک تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی شناخته شده است بنابراین احتمال می‌رود که میزان فعالیت نیتروژناز در سویه‌هایی که قابلیت تثبیت را از خود نشان ندادند به قدری کم بوده که توسط روش کروماتوگرافی گازی قابل اندازه‌گیری نمی‌باشد. بنابراین روش‌های دیگری مانند روش‌های ایزوتوپی برای اندازه‌گیری فعالیت نیتروژناز توصیه می‌شود. اندازه‌گیری فعالیت نیتروژناز

اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور: آزمون نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور با استفاده از محیط کشت Cas آگار انجام گرفت. برای تهیه این محیط بر اساس روش اصلاح‌شده الکساندر و زوبرر (۱۹۹۳) چهار محلول، معرف Fe-CAS، محلول بافر، محلول غذایی و محلول کاز آمینواسید به‌طور مجزا تهیه و استریل شد (۲). پس از آماده شدن ۴ محلول فوق، محلول غذایی به محلول بافر و محلول کاز آمینواسید اضافه می‌گردد سپس همراه باهم زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول معرف Fe-CAS به آن‌ها اضافه و در ظروف پتری پخش گردید و پس از جامد شدن محیط، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به روش لکه‌گذاری روی ظروف پتری‌ها 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 فواصل زمانی ۹۶ ساعت ارزیابی گردید.

**اندازه‌گیری نیمه‌کمی توانایی تولید سیانید هیدروژن:**  
برای اندازه‌گیری میزان تولید سیانید هیدروژن ابتدا جدایه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط TSA<sup>۱</sup> (که بر حسب گرم در لیتر شامل: ۵ Soy flour diagested, ۱۵ Hydrolyze casein, with pepsin enzyme, ۵ NaCl, ۱۵ Agar) غنی شده با گلاسیسین (۴/۴ گرم در لیتر) کشت شدند. سپس کاغذ صافی‌های خیس‌انده شده در پیکرات سدیم (پیکریک اسید ۰/۵٪ و کربنات سدیم ۲٪) در قسمت داخلی درب پلیت گذاشته و اطراف درب آن با نوار پارافیلیم بسته شد. پلیت‌ها به‌مدت ۱۲۰ ساعت داخل گرمخانه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی گردید (۳).

1- Trypyone Soya Agar

پژوهش نشان داد که ۳۴ جدایه از بین ۶۳ جدایه این توانایی را داشتند و بالاترین میزان آن ۸/۳ نانومول اتیلن بر ساعت گزارش نمودند (۱۵). تجرا و همکاران (۲۰۰۵) مقدار تثبیت نیتروژن توسط ازتوباکتر کروکوکوم را بین ۷۹/۶ تا ۳۲۹/۵ نانومول اتیلن بر ساعت گزارش نمودند (۲۴).

توسط روش احیاء استیلن و کروماتوگرافی گازی برای مقادیر بالای تثبیت نیتروژن و یا به عبارتی فعالیت بالای آنزیم نیتروژناز مناسب است؛ در حالی که در روش‌های ایزوتوپی حتی مقادیر بسیار پایین تثبیت نیز قابل اندازه‌گیری هستند (۱۰). رجایی و همکاران (۲۰۰۷) توانایی تثبیت بیولوژیک نیتروژن مولکولی را در ۶۳ جدایه ازتوباکتر مورد بررسی قرار دادند، نتایج این

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس.

Table 2. The results of variance analysis.

میانگین مربعات										
منابع تغییر	فسفر	پتاسیم	اکسین	تثبیت نیتروژن مولکولی	سیدروفور					
Source variation	Phosphorus	Potassium	Auxin	Molecular nitrogen fixation	Siderophore					
ساعت قرائت	۲۴ ساعت	۷۲ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	۲۴ ساعت	۱۲۰ ساعت	۹۶ ساعت	۹۶ ساعت
Reading time	24 hour	72 hour	72 hour	96 hour	72 hour	96 hour	24 hour	120 hour	96 hour	96 hour
بakteri	23801**	22660**	134**	135**	1461**	1848**	1588**	9268**	4.3**	
Bacteria	23801**	22660**	134**	135**	1461**	1848**	1588**	9268**	4.3**	
خطا	1.0	0.66	0.30	0.41	0.004	0.003	0.002	0.006	0.04	
Error	1.0	0.66	0.30	0.41	0.004	0.003	0.002	0.006	0.04	
تغییرات (%)	1.1	0.86	0.31	0.28	0.67	0.63	0.49	0.31	9.0	
Change variation	1.1	0.86	0.31	0.28	0.67	0.63	0.49	0.31	9.0	

\*\* معنی‌داری در سطح ۱ درصد.

\*\* Significantly at the %1 level.

جدول ۳- میانگین مقدار نیتروژن تثبیت شده در مدت زمان ۲۴ ساعت.

Table 3. The average of fixed nitrogen at 24 hours.

شماره جدایه	قرائت در ۲۴ ساعت	شماره جدایه	قرائت در ۲۴ ساعت	شماره جدایه	قرائت در ۲۴ ساعت	شماره جدایه	قرائت در ۲۴ ساعت
Isolate number	Reading at 24 hour (nMC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h.vial)	Isolate number	Reading at 24 hour (nMC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h.vial)	Isolate number	Reading at 24 hour (nMC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h.vial)	Isolate number	Reading at 24 hour (nMC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h.vial)
1	227 <sup>b</sup>	12	82.7 <sup>C</sup>	23	169 <sup>e</sup>	34	60.7 <sup>L</sup>
2	140 <sup>b</sup>	13	137 <sup>j</sup>	24	104 <sup>s</sup>	35	137 <sup>i</sup>
3	276 <sup>a</sup>	14	119 <sup>n</sup>	25	153 <sup>s</sup>	36	71.9 <sup>G</sup>
4	0	15	107 <sup>f</sup>	26	111 <sup>p</sup>	37	93.5 <sup>y</sup>
5	0	16	98.8 <sup>v</sup>	27	80.9 <sup>D</sup>	38	79.9 <sup>E</sup>
6	54.5 <sup>M</sup>	17	79.3 <sup>F</sup>	28	70.4 <sup>H</sup>	39	85.2 <sup>B</sup>
7	123 <sup>m</sup>	18	95.2 <sup>w</sup>	29	92.9 <sup>z</sup>	40	66.6 <sup>J</sup>
8	126 <sup>k</sup>	19	162 <sup>f</sup>	30	176 <sup>d</sup>	41	98.8 <sup>u</sup>
9	124 <sup>l</sup>	20	186 <sup>e</sup>	31	109 <sup>q</sup>	42	68.4 <sup>I</sup>
10	0 <sup>N</sup>	21	93.9 <sup>x</sup>	32	66.0 <sup>K</sup>	43	85.5 <sup>A</sup>
11	115 <sup>o</sup>	22	103 <sup>t</sup>	33	0		

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار.

The same alphabet shows non-significant difference.

کمک کند. در یک پژوهش، گارگ و همکاران (۲۰۰۱) گزارش دادند که گونه ازتوباکتر کروکوکوم قادر است غلظت فسفر محلول را در محیط آبی در حضور سوبسترای آلی افزایش دهد (۴). در واقع توانایی انحلال فسفات در محیط به عوامل مختلف بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به نوع و مقدار اسیدهای آلی، نوع منبع کربنی مورد استفاده میکروارگانیسم‌ها، نوع منبع فسفات (مینرالوژی و ترکیب شیمیایی منبع فسفات)، سایر عناصر مانند فلزات سنگین و نوع محیط کشت اشاره نمود. تمامی این عوامل قادر هستند پتانسیل انحلال فسفات در میکروارگانیسم‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۱۸).

اندازه‌گیری کمی توان حل فسفات معدنی: بر اساس نتایج تجزیه واریانس، حلالیت فسفر از تری‌کلسیم فسفات در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. تمام ۴۳ جدایه توانایی انحلال فسفر را داشتند. بیش‌ترین میزان انحلال فسفر در زمان ۴۸ ساعت بوده است و در این زمان بیش‌ترین میزان انحلال مربوط به جدایه شماره ۲۵ و کم‌ترین میزان انحلال مربوط به جدایه شماره ۲۶ می‌باشد. از مجموع جدایه‌های مورد بررسی تعداد ۱۱ جدایه بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فسفر را در محیط مایع آزاد نمودند. که این مقدار نشان‌دهنده این است که این باکتری توانایی حل فسفات معدنی در محیط را دارا می‌باشد و از این راه هم می‌تواند به گیاه

جدول ۴- میانگین مقدار انحلال فسفر در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

Table 4. The average of phosphorus dissolution at 24, 48 and 72 hours.

قرائت در ۷۲ ساعت	قرائت در ۴۸ ساعت (میلی گرم در لیتر)	قرائت در ۲۴ ساعت	شماره جدایه	قرائت در ۷۲ ساعت	قرائت در ۴۸ ساعت (میلی گرم در لیتر)	قرائت در ۲۴ ساعت	جدایه‌ها Isolates
Reading at 72 hour	Reading at 48 hour (milligram/Liter)	Reading at 24 hour	Isolate number	Reading at 72 hour	Reading at 48 hour (milligram/Liter)	Reading at 24 hour	
180 <sup>j</sup>	176 <sup>m</sup>	161.9 <sup>m</sup>	23	225 <sup>a</sup>	220 <sup>d</sup>	186 <sup>i</sup>	1
36.5 <sup>o</sup>	29.8 <sup>u</sup>	22.1 <sup>r</sup>	24	21.5 <sup>t</sup>	36.6 <sup>q</sup>	24.1 <sup>q</sup>	2
219 <sup>b</sup>	232 <sup>a</sup>	146 <sup>b</sup>	25	35.6 <sup>o</sup>	213 <sup>e</sup>	202 <sup>e</sup>	3
0.41 <sup>z</sup>	1.3 <sup>z</sup>	3.0 <sup>z</sup>	26	47.3 <sup>m</sup>	32.4 <sup>st</sup>	22.0 <sup>r</sup>	4
23.9 <sup>s</sup>	26.8 <sup>v</sup>	11.8 <sup>wv</sup>	27	12.6 <sup>v</sup>	17.2 <sup>y</sup>	13.0 <sup>v</sup>	5
14.8 <sup>u</sup>	17.0 <sup>y</sup>	10.7 <sup>wx</sup>	28	12.3 <sup>wv</sup>	17.5 <sup>y</sup>	7.9 <sup>z</sup>	6
202 <sup>ed</sup>	222 <sup>c</sup>	183 <sup>j</sup>	29	20.7 <sup>t</sup>	64.7 <sup>p</sup>	17.1 <sup>t</sup>	7
189 <sup>g</sup>	193 <sup>j</sup>	209 <sup>d</sup>	30	36.2 <sup>o</sup>	36.6 <sup>q</sup>	27.0 <sup>p</sup>	8
197 <sup>f</sup>	204 <sup>i</sup>	182 <sup>kj</sup>	31	16.0 <sup>u</sup>	16.4 <sup>y</sup>	12.7 <sup>v</sup>	9
11.2 <sup>wx</sup>	14.5 <sup>z</sup>	7.2 <sup>z</sup>	32	4.7 <sup>y</sup>	4.2 <sup>z</sup>	8.1 <sup>yz</sup>	10
201 <sup>e</sup>	210 <sup>f</sup>	225 <sup>a</sup>	33	41.1 <sup>n</sup>	38.8 <sup>q</sup>	30.1 <sup>o</sup>	11
33.7 <sup>p</sup>	29.8 <sup>u</sup>	12.9 <sup>v</sup>	34	20.7 <sup>t</sup>	20.6 <sup>x</sup>	14.9 <sup>u</sup>	12
187 <sup>h</sup>	186 <sup>l</sup>	176 <sup>l</sup>	35	206 <sup>c</sup>	224 <sup>b</sup>	198 <sup>f</sup>	13
20.8 <sup>t</sup>	21.5 <sup>x</sup>	8.5 <sup>yz</sup>	36	33.6 <sup>op</sup>	31.1 <sup>st</sup>	22.3 <sup>r</sup>	14
203 <sup>d</sup>	206 <sup>h</sup>	175 <sup>l</sup>	37	206 <sup>c</sup>	219 <sup>d</sup>	213 <sup>c</sup>	15
202 <sup>ed</sup>	190 <sup>k</sup>	194 <sup>g</sup>	38	2.1 <sup>z</sup>	8.5 <sup>z</sup>	5.5 <sup>z</sup>	16
32.4 <sup>q</sup>	33.4 <sup>r</sup>	9.6 <sup>x</sup>	39	11.6 <sup>wvx</sup>	23.1 <sup>w</sup>	12.3 <sup>wv</sup>	17
11.0 <sup>x</sup>	12.9 <sup>z</sup>	11.5 <sup>wv</sup>	40	175 <sup>k</sup>	191.2 <sup>k</sup>	199 <sup>f</sup>	18
163 <sup>l</sup>	173 <sup>n</sup>	191 <sup>h</sup>	41	177 <sup>j</sup>	208 <sup>g</sup>	194 <sup>g</sup>	19
201 <sup>e</sup>	207 <sup>g</sup>	182 <sup>kj</sup>	42	177 <sup>j</sup>	190 <sup>k</sup>	181 <sup>k</sup>	20
177 <sup>j</sup>	130 <sup>o</sup>	84.3 <sup>n</sup>	43	27.0 <sup>r</sup>	32.1 <sup>st</sup>	21.8 <sup>r</sup>	21
				33.1 <sup>op</sup>	25.6 <sup>v</sup>	18.8 <sup>s</sup>	22

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

The same alphabet shows non-significant difference.



پتاسیم حل شده در زمان ۷۲ ساعت مربوط به جدایه ۲۳ و کمترین مربوط به جدایه ۴۳ می‌باشد. شنگ و یان هه (۲۰۰۶)، وسی (۲۰۰۳) و سوگوماران و جانارتانام (۲۰۰۷) نتایج مشابهی را در این زمینه بیان داشتند (۲۱، ۲۶، ۲۳).

اندازه‌گیری کمی حلالیت پتاسیم معدنی: بر اساس نتایج تجزیه واریانس، آزادسازی پتاسیم از موسکویت در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی موسکویت در جدول ۵ نشان داده شده است. بیش‌ترین مقدار

جدول ۵- میانگین مقدار انحلال پتاسیم حل شده در زمان های ۷۲ و ۹۶ ساعت.

Table 5. The average of potassium dissolution at 72 and 96 hours.

قرائت در ۹۶ ساعت (میلی‌گرم در لیتر) Reading at 96 hour (milligram/Liter)	قرائت در ۷۲ ساعت (میلی‌گرم در لیتر) Reading at 72 hour (milligram/Liter)	شماره جدایه Isolate number	قرائت در ۹۶ ساعت (میلی‌گرم در لیتر) Reading at 96 hour (milligram/Liter)	قرائت در ۷۲ ساعت (میلی‌گرم در لیتر) Reading at 72 hour (milligram/Liter)	جدایه‌ها Isolates
23.7 <sup>i</sup>	47.3 <sup>a</sup>	23	12.9 <sup>n</sup>	21.5 <sup>j</sup>	1
28.0 <sup>g</sup>	25.8 <sup>h</sup>	24	19.4 <sup>k</sup>	23.7 <sup>i</sup>	2
25.9 <sup>h</sup>	28.0 <sup>g</sup>	25	30.2 <sup>f</sup>	30.1 <sup>f</sup>	3
28.0 <sup>g</sup>	32.3 <sup>e</sup>	26	30.2 <sup>f</sup>	25.8 <sup>h</sup>	4
25.9 <sup>h</sup>	32.3 <sup>e</sup>	27	28.0 <sup>g</sup>	28.0 <sup>g</sup>	5
28.0 <sup>g</sup>	28.0 <sup>g</sup>	28	32.4 <sup>e</sup>	28.0 <sup>g</sup>	6
21.6 <sup>j</sup>	15.0 <sup>l</sup>	29	30.2 <sup>f</sup>	32.3 <sup>e</sup>	7
30.2 <sup>f</sup>	25.8 <sup>h</sup>	30	34.5 <sup>d</sup>	25.8 <sup>h</sup>	8
25.9 <sup>h</sup>	23.7 <sup>i</sup>	31	36.7 <sup>c</sup>	28.0 <sup>g</sup>	9
30.2 <sup>f</sup>	25.8 <sup>h</sup>	32	32.4 <sup>e</sup>	28.0 <sup>g</sup>	10
17.2 <sup>l</sup>	12.9 <sup>m</sup>	33	25.9 <sup>h</sup>	28.0 <sup>g</sup>	11
25.9 <sup>h</sup>	30.1 <sup>f</sup>	34	23.7 <sup>i</sup>	23.7 <sup>i</sup>	12
32.41 <sup>e</sup>	36.6 <sup>c</sup>	35	41.0 <sup>a</sup>	40.9 <sup>b</sup>	13
25.93 <sup>h</sup>	30.1 <sup>f</sup>	36	30.2 <sup>f</sup>	23.7 <sup>i</sup>	14
38.89 <sup>b</sup>	32.3 <sup>e</sup>	37	15.1 <sup>m</sup>	15.0 <sup>l</sup>	15
38.89 <sup>b</sup>	32.3 <sup>e</sup>	38	28.0 <sup>g</sup>	21.5 <sup>j</sup>	16
23.77 <sup>i</sup>	28.0 <sup>g</sup>	39	21.6 <sup>j</sup>	30.1 <sup>f</sup>	17
19.45 <sup>k</sup>	19.3 <sup>k</sup>	40	28.0 <sup>g</sup>	25.8 <sup>h</sup>	18
30.25 <sup>f</sup>	25.8 <sup>h</sup>	41	28.0 <sup>g</sup>	25/8 <sup>h</sup>	19
21.61 <sup>j</sup>	23.7 <sup>i</sup>	42	23.7 <sup>i</sup>	25.8 <sup>h</sup>	20
10.80 <sup>o</sup>	10.7 <sup>n</sup>	43	36.7 <sup>c</sup>	28.0 <sup>g</sup>	21
			34.5 <sup>d</sup>	34.4 <sup>d</sup>	22

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

The same alphabet shows non-significant difference.

جدول ۶ نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان تولید این هورمون در زمان ۹۶ ساعت بوده است و در این زمان بیش‌ترین میزان تولید مربوط به جدایه شماره ۳۷ با مقدار ۹۸ میلی‌گرم در لیتر و کم‌ترین

اندازه‌گیری کمی توان تولید هورمون اکسین (IAA): بر اساس نتایج تجزیه واریانس، توانایی تولید هورمون اکسین در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین مقدار هورمون تولید شده در

HPLC<sup>۱</sup> اندازه‌گیری نمودند و بیش‌ترین مقدار تولید اکسین را برای بعضی جدایه‌های ازتوباکتر (mg/l)  $10 \pm 90/8$  به دست آوردند (۲۷). روبیو و همکاران (۲۰۰۰) در پژوهشی میزان تولید اکسین را در جدایه‌های مختلف ازتوباکتر، سودوموناس و اینتروباکتريا بررسی نموده و حداکثر مقدار تولید اکسین را در جدایه‌های ازتوباکتر کروکوکوم و در فاز ایستایی رشد گزارش نمودند (۱۹).

میزان انحلال مربوط به جدایه شماره ۱۷ می‌باشد. از دیرباز ازتوباکتر به‌عنوان یک باکتری تولیدکننده اکسین معرفی شده است که می‌تواند گیاه را از این لحاظ به خوبی حمایت کند. به گزارش احمد و همکاران (۲۰۰۵) هنگامی که به محیط کشت ازتوباکتر تریپتوفان اضافه شود، این باکتری هورمون اکسین تولید می‌کند (۱). یاسمین و همکاران (۲۰۰۴) میزان تولید اکسین توسط جدایه‌هایی از ازتوباکتر، آروسپرلیوم و باسیلوس را با روش

جدول ۶- میانگین مقدار اکسین تولید شده در زمان‌های ۹۶، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت.

Table 6. The average of produced auxin at 72, 96 and 120 hours.

قرائت در ۱۲۰ ساعت	قرائت در ۹۶ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	قرائت در ۷۲ ساعت	شماره جدایه	قرائت در ۱۲۰ ساعت	قرائت در ۹۶ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	قرائت در ۷۲ ساعت	جدایه‌ها Isolates
Reading at 120 hour	Reading at 96 hour (mg/L)	Reading at 72 hour	Isolate number	Reading at 120 hour	Reading at 96 hour (mg/L)	Reading at 72 hour	
0.00 <sup>z</sup>	0.29 <sup>zy</sup>	1.2 <sup>z</sup>	23	3.2 <sup>l</sup>	3.5 <sup>l</sup>	4.7 <sup>jj</sup>	1
0.42 <sup>v</sup>	0.92 <sup>u</sup>	1.3 <sup>zy</sup>	24	0.65 <sup>t</sup>	0.87 <sup>u</sup>	4.4 <sup>k</sup>	2
2.0 <sup>n</sup>	2.5 <sup>m</sup>	4.2 <sup>l</sup>	25	0.22 <sup>s</sup>	0.51 <sup>x</sup>	1.7 <sup>ts</sup>	3
1.2 <sup>r</sup>	1.1 <sup>s</sup>	1.6 <sup>uu</sup>	26	1.5 <sup>q</sup>	1.7 <sup>p</sup>	2.5 <sup>o</sup>	4
2.5 <sup>m</sup>	2.3 <sup>n</sup>	4.1 <sup>m</sup>	27	4.8 <sup>i</sup>	4.5 <sup>i</sup>	4.8 <sup>i</sup>	5
4.1 <sup>k</sup>	3.6 <sup>k</sup>	4.5 <sup>k</sup>	28	1.8 <sup>o</sup>	2.0 <sup>o</sup>	3.7 <sup>n</sup>	6
81.0 <sup>c</sup>	97.2 <sup>b</sup>	85.4 <sup>c</sup>	29	22.1 <sup>d</sup>	6.23 <sup>d</sup>	18.3 <sup>c</sup>	7
0.55 <sup>u</sup>	0.18 <sup>z</sup>	1.5 <sup>xv</sup>	30	0.47 <sup>v</sup>	0.88 <sup>u</sup>	1.9 <sup>f</sup>	8
0.07 <sup>zy</sup>	0.23 <sup>z</sup>	1.2 <sup>z</sup>	31	0.96 <sup>s</sup>	1.0 <sup>t</sup>	1.7 <sup>ts</sup>	9
1.7 <sup>p</sup>	1.3 <sup>f</sup>	1.7 <sup>ts</sup>	32	0.44 <sup>v</sup>	0.62 <sup>wv</sup>	1.9 <sup>f</sup>	10
17.5 <sup>c</sup>	20.0 <sup>c</sup>	20.6 <sup>d</sup>	33	0.32 <sup>w</sup>	0.51 <sup>x</sup>	1.5 <sup>xw</sup>	11
7.5 <sup>e</sup>	5.6 <sup>h</sup>	4.9 <sup>h</sup>	34	0.32 <sup>w</sup>	0.57 <sup>wx</sup>	1.6 <sup>vu</sup>	12
0.18 <sup>x</sup>	0.33 <sup>y</sup>	1.4 <sup>yx</sup>	35	7.9 <sup>f</sup>	8.3 <sup>f</sup>	10.2 <sup>f</sup>	13
1.5 <sup>q</sup>	0.88 <sup>u</sup>	1.6 <sup>vw</sup>	36	0.23 <sup>x</sup>	0.28 <sup>zy</sup>	1.6 <sup>vw</sup>	14
95.2 <sup>a</sup>	98.0 <sup>a</sup>	88.7 <sup>b</sup>	37	2.6 <sup>m</sup>	1.8 <sup>p</sup>	2.2 <sup>q</sup>	15
93.7 <sup>b</sup>	96.4 <sup>c</sup>	88.9 <sup>a</sup>	38	0.02 <sup>z</sup>	0.25 <sup>zy</sup>	1.3 <sup>z</sup>	16
0.65 <sup>t</sup>	1.0 <sup>ts</sup>	1.8 <sup>s</sup>	39	0.10 <sup>y</sup>	0.18 <sup>z</sup>	1.3 <sup>z</sup>	17
0.62 <sup>uu</sup>	0.67 <sup>v</sup>	1.43 <sup>yx</sup>	40	0.08 <sup>zy</sup>	0.23 <sup>z</sup>	1.4 <sup>x</sup>	18
0.05 <sup>zy</sup>	0.21 <sup>z</sup>	1.32 <sup>z</sup>	41	0.23 <sup>s</sup>	0.57 <sup>wx</sup>	1.5 <sup>w</sup>	19
3.2 <sup>l</sup>	4.0 <sup>j</sup>	4.69 <sup>j</sup>	42	0.05 <sup>zy</sup>	0.28 <sup>zy</sup>	1.7 <sup>ts</sup>	20
4.5 <sup>j</sup>	5.7 <sup>e</sup>	7.25 <sup>e</sup>	43	1.3 <sup>r</sup>	1.5 <sup>q</sup>	2.3 <sup>p</sup>	21
				5.2 <sup>h</sup>	1.0 <sup>t</sup>	1.5 <sup>w</sup>	22

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار.

The same alphabet shows non-significant difference.

#### 1- High pressure Liquid Chromatography

روی محیط، بیش از ۹۰ درصد آن‌ها قابلیت تولید سیدروفورها را از خود نشان دادند و تنها در حدود ۹/۶ درصد واکنش تغییر رنگ در محیط ایجاد نکرده که نشان‌دهنده عدم تولید سیدروفور می‌باشد (۱۵). رنگ هاله ایجاد شده اطراف کلنی در برخی جدایه‌ها روشن‌تر و در برخی جدایه‌ها تیره‌تر بود. هاله اطراف کلنی همه جدایه‌های ازتوباکتر مورد بررسی در این پژوهش، نارنجی تا نارنجی مایل به قرمز بود. میلاگرس و همکاران (۱۹۹۹) عقیده دارند که در محیط Cas-agar سیدروفورهای منوهیدروکسامات و تری هیدروکسامات به ترتیب به رنگ نارنجی مایل به قرمز و نارنجی ایجاد می‌کنند، در حالی که کمپلکس‌های کاتکولی موجب تغییر رنگ محیط از آبی به ارغوانی تا قرمز مایل به ارغوانی می‌گردند (۱۲). با استناد به گزارش‌های مذکور، می‌توان احتمال داد که اکثر سیدروفورهای تولید شده توسط جدایه‌های مورد بررسی از نوع هیدروکسامات باشند.

اندازه‌گیری نیمه کمی توان تولید سیدروفور: بر اساس نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان تولید سیدروفور در جدایه‌های مورد آزمایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار است. ارزیابی تولید سیدروفور نشان داد که ۴۲ جدایه از ۴۳ مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور را داشتند. متوسط قطر هاله به کلنی در جدایه‌های مختلف ازتوباکتر در زمان ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد. جدایه شماره‌های ۴، ۹، ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۷، ۳۸، ۴۰، ۴۱ و ۴۳ دارای بیش‌ترین نسبت قطر هاله به کلنی بوده‌اند. در جدایه شماره ۱۲ هاله‌ای در اطراف کلنی رشد کرده مشاهده نشد، نتایج به دست آمده با نتایج شیوپراساد و پیچ (۱۹۸۹) مطابقت دارد (۲۲). رجایی و همکاران (۲۰۰۷) توانایی تولید سیدروفور را در جدایه‌های ازتوباکتر 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 رشد یافته بر

جدول ۷- نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه‌های مختلف.

Table 7. The ratio of halo diameter to colony in various isolates.

شماره جدایه	نسبت قطر هاله به کلنی	شماره جدایه	نسبت قطر هاله به کلنی	شماره جدایه	نسبت قطر هاله به کلنی	شماره جدایه	نسبت قطر هاله به کلنی
Isolate number	The ratio of halo diameter to colony	Isolate number	The ratio of halo diameter to colony	Isolate number	The ratio of halo diameter to colony	Isolate number	The ratio of halo diameter to colony
34	*	23	*	12	دیده نشد	1	**
35	*	24	*	13	*	2	*
36	**	25	**	14	*	3	*
37	*	26	*	15	**	4	***
38	*	27	*	16	***	5	*
39	*	28	*	17	*	6	**
40	**	29	**	18	***	7	*
41	*	30	*	19	*	8	*
42	***	31	***	20	**	9	***
43	*	32	*	21	*	10	**
	**	33	**	33	33	22	22

\* نسبت قطر هاله به کلنی بین ۱ تا ۲.

\* The ratio of halo diameter to colony between 1 to 2.

\*\* نسبت قطر هاله به کلنی بین ۲ تا ۳.

\*\* The ratio of halo diameter to colony between 2 to 3.

\*\*\* نسبت قطر هاله به کلنی بیش‌تر از ۳.

\*\*\* The ratio of halo diameter to colony more than 3.

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که جدایه‌های ازتوباکتر جداسازی شده از خاک‌های استان گلستان دارای توانمندی‌های متفاوتی از نظر ویژگی‌های محرک رشدی بوده و بیش‌ترین مقادیر تثبیت بیولوژیک نیتروژن، انحلال فسفات و پتاسیم، توانایی تولید سیدروفور و اکسین در جدایه‌های مختلفی به‌دست آمد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در جدایه‌های مختلف ازتوباکتر، به‌نظر می‌رسد برخی از جدایه‌ها قابلیت استفاده به‌عنوان محرک رشد گیاه را دارا می‌باشند. در این پژوهش فقط خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های ازتوباکتر تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. بنابراین بایستی قابلیت جدایه‌های مذکور برای بهبود رشد گیاه در شرایط گلخانه‌ای مورد ارزیابی قرار گیرد. یکی از شاخص‌های مهم در استفاده از جدایه‌های میکروبی جداسازی آن‌ها از اکوسیستم‌های خاک همان منطقه است. بنابراین بایستی آزمایش‌های مزرعه‌ای با جدایه‌های منتخب صورت گیرد تا کارایی آن‌ها برای استفاده به‌عنوان کود زیستی مورد ارزیابی قرار گیرد.

اندازه‌گیری نیمه کمی توانایی تولید سیانید هیدروژن:

نتایج حاصل از ارزیابی سیانید هیدروژن نشان داد که میزان تولید سیانید هیدروژن، جدایه شماره ۴۳ در کل جدایه مورد مطالعه در حد زیاد، جدایه شماره ۲۵ متوسط و جدایه ۳۱ و ۳۳ در حد کم و بقیه جدایه‌های بدون توانایی تولید سیانید هیدروژن می‌باشند. پژوهش‌های انجام شده توسط کرمر و سوئیسی (۲۰۰۱) نیز نشان داده است که تقریباً ۳۲ درصد از یک مجموعه شامل ۲۰۰۰ جدایه باکتری، توانایی تولید سیانید داشته‌اند. مقدار HCN تولید شده از صفر تا کمی بیش از ۳۰ نانومول به‌ازای هر میلی‌گرم سلول متغیر بوده است. به عقیده آن‌ها تولید HCN با افزایش مقدار گلايسین در محیط افزایش می‌یابد. آن‌ها همچنین پیشنهاد کردند که توانایی تولید HCN توسط باکتری‌های PGPR یک قابلیت بالقوه و مکانیسمی مناسب برای کنترل بیولوژیک علف‌های هرز می‌باشد که می‌بایست به‌عنوان یک جنبه جدید در روش‌های تقویت و تحریک رشد گیاهان زراعی و افزایش عملکرد محصول، بیش‌تر مورد توجه قرار گیرد (۸).

## منابع

- Ahmad, F., Ahmah, I., and Khan, M.S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolated of *Azotobacter* and *Fluorescent Pseudomonas* in the presence and absence of Tryptophan. *Turk. J. Biol.* 82: 29-34.
- 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.
- Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., and Perez-Galdona, B. 2004. Screening for plant growth-promoting *rhizobacteria* in *Chamaecytisus proligerus*, a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant Soil.* 226: 967-978.
- 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.
- Jinguo, H.U., Seiler, G., and Kole, Ch. 2010. Genetics, genomics and Breeding of sunflower. *America*, 353p.
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., and Kecskés, M.L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in cropfarming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry.* 36: 1229-1244.

7. Khodr, H.H., Hider, R.C., and Klair, A.K.D. 2002. The iron-binding properties of aminochelin, the mono (catecholamide) siderophore of *Azotobacter vinelandii*. J. Biol. Inorg. Chem. 7: 891-896.
8. Kremer, R.J., and Souissi, T. 2001. Cyanide production by *rhizobacteria* and potential for suppression of weed seedling growth. Curr. Microbiol. 43: 182-186.
9. Krieg, N.R. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, 1136p.
10. Martensson, A.M., and Ljunggren, H.D. 1984. A comparison between the acetylene reduction method, the isotope dilution method and the total nitrogen difference method for measuring nitrogen fixation in lucerne. Plant Soil. 81: 177-184.
11. Mehta, S., and Nautiyal, C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiol. 43: 51-56.
12. Milagers, M.F., Machuca, A., and Napoleao, D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by chrome azurol S (CAS) agar plate assay. J. Microbiol. Method. 37: 1-6.
13. Mrkovacki, N., and Milic, V. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potential useful in agricultural application. Ann. Microbiol. 51: 145-158.
14. Narula, N., and Gupta, K.G. 1986. Ammonia excretion by *Azotobacter chroococcum* in liquid culture and soil in the presence of manganese and clay minerals. Plant Soil. 93: 205-209.
15. Rajayi, S., Alikhani, H., and Raeisi, F. 2007. Effect of growth stimulating potentials of native strains of *Azotobacter chroococcum* on growth, yield and nutrients absorption in wheat. J. Sci. Technol. Agric. 11: 285-296. (In Persian)
16. Rasouli Sedighani, H., Khavari, K., Rahimian, H., Malakuti, M., and Asadi Rahmani, H. 1384. Investigation of population density and Fluorescent *Pseudomonas* at wheat rhizosphere in different regions of Iran. J. Soil Water. 19: 2-10. (In Persian)
17. Ravikumar, S., Kathiresan, K., Ignatiammal, S.T.M., Selvam, M.B., and Shanthi, S. 2004. Nitrogen-fixation *Azotobacters* from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 15: 157-160.
18. Rodriguez, H., and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech. Adv. 13: 712-772.
19. 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 Latinoamericana de Microbiologia. 8: 171-176.
20. Savostin, P. 1971. Microbial Transformation of Silicates. Pflanzenernahr-bodenk. 132: 37-45.
21. Sheng, X.F., and Yan He, L. 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Can. J. Microbiol. 52: 66-72.
22. Shivprasad, S., and Page, W.J. 1989. Catechole formation and melanization by Na<sup>+</sup>-dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aerodation. Al Environment Microbiol. 55: 1811-1817.
23. Sugumaran, P., and Janarthanam, B. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World J. Agric. Sci. 3: 350-355.
24. Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M.V., and González-López, J. 2005. Isolation and characterization *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. Plant and Soil. 270: 223-232.
25. Vella, G.R. 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil. Al Microbiol. 28: 77-79.
26. Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting *rhizobacteria* as biofertilizers. Plant Soil. 255: 571-586.
27. Yasmin, S., Bakar, M.A.R., Malik, K.A., and Hafeez, F. 2004. Isolation, characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanibar soils. J. Basic Microbiol. 44: 241-252.



## Evaluation of plant growth promotion characteristics of native soil *Azotobacter* isolates from Golestan province

\*A. Behrooz<sup>1</sup>, M. Olamaee<sup>2</sup>, S.A.R. Movahedi Naeeni<sup>2</sup> and R. Ghorbani Nasrabadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, <sup>2</sup>Associate Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, <sup>3</sup>Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 06/10/2014; Accepted: 09/23/2014

### Abstract

**Background and Objectives:** In recent decades, efforts to increase the production per area unit, unbalanced and high consumption of chemical fertilizers are consequences of environmental degradation. Using bio-fertilizers without worrying about environmental negative effects improve the soil physical, chemical and biological conditions by supplying a part of the plant requirement to nutrients. *Azotobacter* is one of the soil microorganisms with the ability of crop growth promoting. The bacterium affect the plant growth parameters directly and indirectly. This study aimed to collect different strains of *Azotobacter* in Golestan province, study its growth promoting properties and identify superior strains.

**Materials and Methods:** The growth stimulating properties were measured including biological fixation of molecular nitrogen by use of acetylene reduction method, the quantitative solubility of phosphorus on the Sperber medium by colorimetric method by spectrophotometer, the quantitative solubility of mineral potassium on the Alexandrov medium by flame photometer, producing the auxin hormone in the LB-tryptophan medium by colorimetric method by spectrophotometer, ability of semi-quantitative producing siderophore on the CAS-Agar medium and ability of producing hydrogen cyanide on the TSA medium. The obtained data from each section were analyzed by SAS software using a completely randomized design and mean comparisons were performed using LSD ( $P < 0.05$ ).

**Results:** Forty-three *Azotobacter* strains were isolated from soil of Golestan province. The results showed that the highest biological fixation of molecular nitrogen belonged to isolate number 3 equals 276 nmol per hour in the tube, the highest power of quantitative solubility of phosphorus to isolate number 25 equals 232 milligrams per liter, the maximum power of quantitative solubility of mineral potassium to isolate number 23 equals 47 milligrams per liter, the highest power of producing the auxin hormone to isolate number 37 equals 98 milligrams per liter and the maximum ratio of halo diameter to colony about measuring ability of half quantitative producing siderophore belonged to isolates number 4, 9, 16, 18, 31, 37, 38, 40, 41 and 43. The ability of producing hydrogen cyanide was also measured and among all isolates only 4 isolates had this ability and the highest production of hydrogen cyanide belonged to isolate number 43.

**Conclusion:** The results of this study showed the *Azotobacter* strains isolated from soil of Golestan province have different capabilities in terms of growth stimulating properties and the highest amounts of nitrogen biological fixation, phosphate and potassium dissolution, capable of producing siderophore and auxin were obtained in different isolates. According to the obtained results in different strains of *Azotobacter*, it seems that some isolates have the potential to be used as plant growth stimulant.

**Keywords:** *Azotobacter*, Growth stimulating, Nitrogen biological fixation

\* Corresponding Authors; Email: afshinbehrooz1989@yahoo.com