



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

\* سودابه دولتی<sup>۱</sup>، محسن علمائی<sup>۲</sup>، مجتبی بارانی مطلق<sup>۲</sup> و عراز محمد نوری راددوجی<sup>۳</sup>  
<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آستادیار گروه علوم خاک،  
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، <sup>۲</sup> مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، استان گلستان  
تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۹

### چکیده

ازتوباکتر از باکتری‌های مهم منطقه ریزوسفر گیاهان زراعی می‌باشد. این پژوهش به منظور جداسازی جدایه‌های ازتوباکتر بومی استان گلستان تحت کشت گیاه سویا و بررسی پتانسیل‌های تحریک رشد در این باکتری‌ها به اجرا درآمد. پس از خالص‌سازی، ۳۰ جدایه انتخاب و توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی با روش احیاء استیلن به اتیلن، توانایی تولید اکسین و انحلال فسفر معدنی با روش رنگ‌سنجی و توانایی تولید سیدروفور با استفاده از محیط Cas-Agar مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین جدایه‌های مختلف از نظر توانایی تولید اکسین و تثبیت بیولوژیک نیتروژن تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیش‌ترین میزان تثبیت نیتروژن در جدایه AZ<sub>۲۶</sub> (به‌میزان ۴۲۸/۲۳ نانومتر در ویال بر هکتار) و کم‌ترین میزان آن در جدایه AZ<sub>۲۷</sub> (به‌میزان ۲۱/۳۹ نانومتر در ویال بر هکتار) مشاهده شد، میزان تولید اکسین در جدایه AZ<sub>۴</sub> حداکثر (۲۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر) و در جدایه AZ<sub>۲۰</sub> حداقل (۰/۰۱۵۷ میلی‌گرم بر لیتر) بود، همچنین بیش‌ترین میزان تولید سیدروفور در جدایه AZ<sub>۹</sub> و کم‌ترین میزان آن در جدایه AZ<sub>۱۸</sub> به‌ترتیب با نسبت قطر هاله بر کلنی ۶/۳۶ و ۲/۲۴ در مدت ۷۲ ساعت مشاهده شد.

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

\* مسئول مکاتبه: [soodabe.dolati@gmail.com](mailto:soodabe.dolati@gmail.com)

## مقدمه

ظرف چند دهه اخیر تلاش برای افزایش تولید در واحد سطح پیامدهایی از جمله مصرف زیاد و نامتعادل کودهای شیمیایی، به ویژه کودهای نیتروژنی را به همراه داشته است که علاوه بر افزایش هزینه تولید اثرات زیست محیطی نامطلوبی را به همراه داشته است. استفاده از کودهای بیولوژیک می تواند ضمن افزایش رشد موجب کاهش مصرف کودهای شیمیایی و آلودگی محیط و بهبود شاخص های کیفیت خاک و در نهایت کشاورزی پایدار شود. یکی از شیوه های بیولوژیکی برای افزایش تولید استفاده بالقوه از موجودات خاکزی مفید که توانایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن مولکولی یا تولید مواد محرک رشد گیاه را داشته، می باشد. باکتری های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)، گروه وسیعی از باکتری های خاکزی هستند که به طور مستقیم و غیرمستقیم موجب تحریک رشد و در نهایت افزایش عملکرد گیاهان می شوند. این گروه از موجودات در محیط ریشه (ریزوسفر) پتانسیل لازم برای اشغال سیستم ریشه گیاهان را دارند (وسی، ۲۰۰۳). ریزوسفر مکانی است که در آنجا اثرات متقابل بین خاک، گیاهان و میکروارگانیسم ها به وقوع می پیوندد. جوامع میکروبی ریزوسفر از نظر کمی و کیفی با جوامع میکروبی خاک غیرریزوسفری تفاوت بسیار زیادی دارد (لینچ، ۱۹۹۰). جنس *ازتوباکتر* نیتروژن مولکولی موجود در اتمسفر را به صورت آزاد تثبیت و وارد خاک می کند. این باکتری از جمله مهم ترین دیازوتروف های تثبیت کننده نیتروژن مولکولی به حساب می آید که در سال های اخیر توجه محققان کشور را به خود جلب کرده است. مطالعات انجام شده در سال های اخیر نشان داده است که گونه های مختلف این باکتری را می توان در زمره انواع باکتری های ریزوسفری محرک رشد گیاه نیز قرار داد. باکتری های جنس *ازتوباکتر* به طور مستقیم و به واسطه تثبیت نیتروژن مولکولی، افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصر غذایی و به خصوص تولید فیتوهورمون های رشد گیاهی (مانند اکسین ها، سیتوکینین ها و...) موجب بهبود شرایط تغذیه و رشد گیاه می شوند. این باکتری به علاوه از طریق کنترل عوامل بیماری زا، به طور غیرمستقیم، نیز به حفظ سلامت گیاه کمک نموده که تأثیر نهایی آن، بهبود رشد و عملکرد گیاهان زراعی می باشد (کادر و همکاران، ۲۰۰۲؛ مرکوواسکی و میلیک، ۲۰۰۱). افزایش قابلیت جذب Fe، Zn و Mo توسط *ازتوباکتر*، همچنین توانایی این باکتری در افزایش انحلال فسفر از ترکیبات نامحلول معدنی به اثبات رسیده است که از جمله روش های افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصر غذایی می باشد (مرکوواسکی و میلیک، ۲۰۰۱؛ نارولا و همکاران، ۲۰۰۰). به عقیده کندی

### 1- Plant Growth Promoting Rhizobacteria

و همکاران (۲۰۰۴) همبستگی نزدیکی بین رشد گیاه و هورمون‌های تولید شده توسط *ازتوباکتر* وجود دارد. کومار و نارولا (۱۹۹۹) توانایی انحلال فسفات معدنی در سویه‌هایی از *ازتوباکتر کروکوکوم* را گزارش نمودند. این دو محقق نشان دادند سویه M-15/*ازتوباکتر کروکوکوم* قادر است غلظت فسفر را در حضور تری‌کلسیم فسفات در حد ۱/۷۷ میکروگرم بر لیتر افزایش دهد.

سیدروفورها از دیگر متابولیت‌های تولید شده توسط *ازتوباکتر* می‌باشند که میل ترکیبی شدید با یون آهن سه‌ظرفیتی دارند. سیدروفورها در واقع نوع خاصی از حامل‌های یونی هستند که افزایش تحرک آهن را به عهده دارند. برخی سلول‌های میکروبی به‌منظور مقابله با تنش کمبود آهن اقدام به ترشح سیدروفور می‌کنند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که جدایه‌هایی از *ازتوباکتر* قادر به تولید سیدروفور در شرایط کمبود آهن می‌باشند و قابلیت تحرک آهن را در ریزوسفر افزایش می‌دهند (شیوپراساد و پیچ، ۱۹۸۹). همچنین *ازتوباکتر* در شرایط نامساعد محیطی از جمله خشکی، کمبود مواد آلی و عناصر غذایی به حالت سیست<sup>۱</sup> در می‌آید (ولا، ۱۹۷۴) و بنابراین استفاده از این باکتری در خاک‌های مناطق خشک ایران نیز می‌تواند مفید باشد.

*ازتوباکتر* شامل ۷ گونه به‌نام‌های *کروکوکوم*<sup>۲</sup>، *وینلانسی*<sup>۳</sup>، *بیجرینکی*<sup>۴</sup>، *نیگریکانس*<sup>۵</sup>، *آرمیناکوس*<sup>۶</sup>، *پاسپالی*<sup>۷</sup> و *سالینستریس*<sup>۸</sup> می‌باشد. *ازتوباکتر کروکوکوم* گونه غالب خاک‌های زراعی در مناطق معتدل می‌باشد. از ویژگی‌های این گونه تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای-سیاه نامحلول در آب است. این رنگ‌دانه به‌علت اکسیداسیون تیروزین به‌وسیله تیروژیناز که یک آنزیم مس‌دار است ایجاد می‌شود (بکینگ، ۲۰۰۶؛ کریچ، ۲۰۰۵). *ازتوباکتر وینلانسی* از نظر مرفولوژی، شبیه *کروکوکوم* است. کلنی‌های آن مانند *کروکوکوم*، لزج نیستند. تولید رنگ‌دانه سبز-زرد محلول در آب از مشخصات این گونه است که در زیر نور فرابنفش به رنگ فلورسنت سبز-زرد دیده می‌شود. *ازتوباکتر بیجرینکی* توسط لیپمان (۱۹۰۴) شناسایی شد و به افتخار بیجرینک به این نام معروف شد. باکتری‌های این گونه، بدون توان حرکت می‌باشند.

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

نام *ازتوباکتر نیگریکانس* از کلمه نیگرا به معنای سیاه گرفته شده است. رنگ سیاه به دلیل تولید رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای - سیاه محلول در آب می‌باشد که توسط بعضی سویه‌های این گونه تولید می‌شوند. سلول‌های رویشی این گونه بدون توان حرکت هستند.

*ازتوباکتر آرمیناکوس* اولین بار از خاک‌های جمهوری ارمنستان جداسازی شد، باکتری‌های این گونه دارای تاژک‌های پیرامونی متحرک، کلنی‌ها صاف با تحدب زیاد، براق و چسبناک هستند. *ازتوباکتر آرمیناکوس* قادر نیست نیترات را به نیتريت و سیستئين و تیوسولفات را به  $H_2S$  تبدیل کند که این ویژگی‌ها در شناسایی این گونه از نیگریکانس اهمیت دارد.

*ازتوباکتر پاسپالی* تنها گونه ازتوباکتر است که با گیاه علفی پاسپالوم نوتاتوم<sup>۱</sup> به روش همیاری قادر به تثبیت نیتروژن می‌باشد. این یکی از اختصاصی‌ترین انواع همیاری شناخته شده است (کریچ، ۲۰۰۵). برخی جدایه‌های *A. chroococcum* روی محیط‌های غذایی مایع متداول برای کشت *Azotobacter* رشد نمی‌کنند. پیچ (۱۹۸۶) با پژوهش روی انواعی از این جدایه‌ها، آن‌ها را *ازتوباکترهای* وابسته به سدیم نامید. پیچ و همکاران (۱۹۹۱) پیشنهاد کردند که این انواع که رشد آن‌ها مشروط به وجود مقدار کافی سدیم در محیط است در گونه جدیدی به نام *ازتوباکتر سالیستریس* قرار گیرند (بکینگ، ۲۰۰۶؛ کریچ، ۲۰۰۵).

### مواد و روش‌ها

**نمونه برداری:** به منظور جداسازی *ازتوباکتر* نمونه برداری از مزارع سویا استان گلستان صورت گرفت و تعداد ۱۶ نمونه خاک از مزارع مختلف جمع‌آوری شد (تاریخ نمونه برداری ۱۳۸۹/۴/۱۴). اطلاعات مربوط به مناطق نمونه برداری در جدول ۱ آورده شده است.

**جداسازی و خالص سازی باکتری:** از هر یک از نمونه‌های خاک ۱ گرم به ۱۰۰ سی سی آب معمولی استریل شده در ارلن ۲۵۰ سی سی اضافه و ۱ ساعت شیک شد، سپس ۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون به محیط کشت اختصاصی وینوگراسکی مایع بدون نیتروژن که در لیتر شامل: ۵۰ میلی لیتر محلول وینوگراسکی (در لیتر شامل: ۵ گرم فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم، ۲/۵ گرم سولفات منیزیم، ۲/۵ گرم کلرید سدیم، ۰/۰۵ گرم سولفات آهن و ۰/۰۵ گرم سولفات منگنز و pH نهایی بر روی ۷/۳ تنظیم گردید)، ۱ میلی لیتر محلول عناصر کم مصرف (در لیتر شامل ۰/۰۵ گرم از هر یک از املاح مولیبدات پتاسیم، برات سدیم، نیترات کبالت، سولفات مس و سولفات روی است)، ۱۰ گرم مانیتول، ۰/۵ گرم کربنات کلسیم و ۹۵۰ میلی لیتر آب مقطر است، اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت به منظور مشاهده

1- *Paspalum Notatum*

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

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

نام منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
روستای نومل	۰۲۷۸۱۸۹	۴۰۸۱۲۵۰
روستای اصفهانکلاته	۰۲۸۲۲۶۵	۴۰۸۱۷۷۲
روستای مرزنکلاته	۰۲۸۵۳۱۷	۴۰۸۲۴۸۹
روستای حسن‌آباد	۰۲۸۸۲۹۱	۴۰۸۲۹۲۲
روستای دارکلاته	۰۳۱۷۷۷۰	۴۰۹۲۶۸۰
روستای دلند	۰۳۳۲۰۵۹	۴۱۰۲۰۱۱
دشت حلقه	۰۳۴۶۴۸۷	۴۱۱۴۳۴۹
جاده گنبد- کلاله	۰۳۵۲۷۷۵	۴۱۲۹۱۷۷
کلاله	۰۳۶۰۰۱۳	۴۱۲۹۷۹۵
جاده آزادشهر- مینودشت	۰۳۴۵۰۴۶	۴۱۱۳۵۳۸
دلند	۰۳۱۶۱۷۵	۴۰۹۱۲۲۲
داخل اصفهانکلاته	۰۲۸۵۴۷۳	۴۰۸۲۶۹۵
سرخنکلاته ۱	۰۲۸۳۸۲۴	۴۰۸۱۷۱۶
سرخنکلاته ۲	۰۲۸۳۶۸۱	۴۰۸۴۰۰۰

#### آزمون‌های تشخیص گونه‌های *ازتوباکتر*

آزمون احیاء نیترات به نیتريت: هدف از انجام این آزمون، تعیین توانایی احیای نیترات به نیتريت، توسط باکتری‌های *ازتوباکتر* می‌باشد. محیط کشت مورد استفاده برای این آزمون در لیتر شامل: ۳ گرم Beef Extract، ۵ گرم Pepton و ۱ گرم  $\text{KNO}_3$  است. پس از تلقیح و کشت ۴۸-۲۴ ساعتی باکتری

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

**آزمون مقاومت به فنول:** گونه‌های مختلف *ازتوباکتر* به وجود فنول در محیط کشت حساس بوده و قادر به رشد در محیط دارای فنول نیستند تنها دو گونه *ازتوباکتر کروکوکوم* و *ازتوباکتر وینلانندی* قادر به رشد در محیط کشت دارای فنول ۰/۰۵ درصد می‌باشند (کریج، ۱۹۸۴). به این ترتیب به منظور جداسازی *ازتوباکتر کروکوکوم* و *وینلانندی* به محیط کشت جامد وینوگرادسکی ۰/۰۵ درصد فنول افزوده و توانایی ایزوله‌ها برای رشد بر روی این محیط بررسی شد.

**آزمون مقاومت به بنزوات سدیم:** در میان تمامی گونه‌های *ازتوباکتر* تنها *ازتوباکتر وینلانندی* قادر به رشد در محیط کشت دارای ۱ درصد سدیم بنزوات می‌باشد (کریج، ۱۹۸۴). با توجه به این قابلیت برای جداسازی *ازتوباکتر وینلانندی* از سایر گونه‌ها به محیط کشت جامد وینوگرادسکی ۱ درصد سدیم بنزوات افزوده و توانایی رشد ایزوله‌ها بر روی این محیط بررسی شد.

#### آزمون‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه

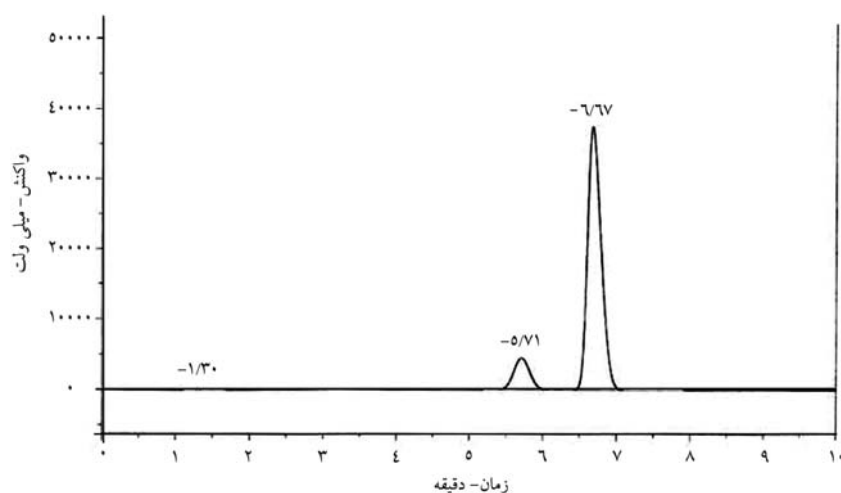
**آزمون کمی توانایی تولید IAA:** برای اندازه‌گیری کمی توانایی تولید IAA<sup>۱</sup> محیط کشت مایع LB-T<sup>۲</sup> تهیه که ترکیبات این محیط در هر لیتر شامل: ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم کلرید سدیم است و pH نهایی بر روی ۷/۴ تنظیم گردید و به این محیط ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر L-Tryptophan به‌عنوان پیش‌ماده تولید اکسین، اضافه شد و با سوسپانسیون میکروبی تازه، تلقیح و

1- Indole Acetic Acid

2- LB-Tryptophan (Luria-Bertani)

به مدت ۴۸ ساعت شیک گردید بعد از سپری شدن این زمان سوسپانسیون میکروبی سانتریفیوژ و محلول شفاف‌رویی به آرامی جدا و ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ۲ میلی‌لیتر معرف سالکوسکی (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۷/۵ میلی‌لیتر  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ۰/۵ مولار) افزوده شد. در نهایت شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید و با استفاده از مقادیر قرائت شده برای استانداردها مقادیر اکسین تولید شده برای نمونه‌ها محاسبه شد (روبیو و همکاران، ۲۰۰۰) (جدول ۴).

**آزمون توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن:** به منظور بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکولی از روش احیاء استیلن به اتیلن (ARA) استفاده شد. ۲ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی به لوله‌های آزمایش شامل محیط کشت مایع وینوگرادسکی (بدون نیتروژن) اضافه گردید، پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، درب پنبه‌ای لوله‌ها با درهای پلاستیکی استریل تعویض شد و ۱۰ درصد حجم هوای داخل لوله با سرنگ تخلیه و به همان میزان گاز استیلن به لوله‌ها تزریق گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدد، ۰/۷ میکرولیتر از هوای داخل لوله با استفاده از سرنگ هامیلتون به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GOW\_MAC) تزریق گردید و سطح زیر منحنی ایجاد شده قرائت شد (راویکومار و همکاران، ۲۰۰۴) (شکل ۱).



شکل ۱- نمونه‌ای از گراف دستگاه کروماتوگرافی گازی پیک اول مربوط به اتیلن و پیک دوم مربوط به استیلن می‌باشد.

## 1- Acetylene Reduction Assay

**توانایی تولید سیدروفور:** آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور با استفاده از محیط کشت Cas-Agar انجام گرفت. این محیط طبق روش اصلاح شده الکساندر و زامبر (۱۹۹۱) تهیه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به روش لکه گذاری روی پلیت ها تلقیح شد، توانایی تولید سیدروفور بر مبنای تغییر رنگ محیط کشت از آبی به نارنجی و با اندازه گیری قطر هاله نسبت به قطر کلنی باکتری در فاصله های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه گیری و طبقه بندی شد (جدول های ۵ و ۶).

**اندازه گیری کمی توانایی انحلال فسفر معدنی:** ابتدا از کشت تازه باکتری یک حلقه پر به ۲۵ میلی لیتر محیط وینوگرادسکی تلقیح نموده و پس از سپری شدن ۴۸ ساعت ۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۲۵ میلی لیتر محیط اسپربر (در لیتر شامل: ۱۰ گرم Glucose، ۰/۵ گرم Yeast Extract، ۱۵ گرم Agar، ۵ گرم  $Ca_3(PO_4)_2$ ، ۰/۲ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  و ۰/۱ گرم  $CaCl_2$ ) افزوده و در دور ۱۲۰ در دقیقه شیک شد. سپس در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۱۲۰ ساعت، ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون در دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و ۱ میلی لیتر از محلول بالایی با ۱ میلی لیتر معرف آمونیوم مولبیدات و انادات و ۳ میلی لیتر آب دی یونیزه مخلوط می شود. 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 شد. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده توسط  $KH_2PO_4$  محاسبه گردید. در ترسیم منحنی استاندارد ۱ میلی لیتر از غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۰ میلی گرم در لیتر  $KH_2PO_4$  با ۳ میلی لیتر محیط وینوگرادسکی (بدون تری کلسیم فسفات) و ۱ میلی لیتر معرف آمونیوم مولبیدات- و انادات مخلوط و سپس میزان جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

## بحث و نتیجه گیری

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

جدول ۲- برخی خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه های مختلف /زئوباکتر خاک های تحت کشت سویا در استان گلستان.

رنگ آمیزی گرم	تحرك	تشكيل سيست	توليد رنگ دانه قهوه ای نامحلول در آب	آزمون کاتالاز	آزمون اکسیداز
گرم منفی	+	+	+	+	+



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

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

شماره جدایه	تعداد جدایه	تست احیاء نیترات به نیتريت	مقاومت به بنزوات سدیم	مقاومت به فنول	گونه منسوب (پیشنهادی)
Az <sub>۱</sub> -Az <sub>۲</sub> -Az <sub>۳</sub> -Az <sub>۴</sub> -Az <sub>۵</sub> -Az <sub>۶</sub> -Az <sub>۷</sub> -Az <sub>۸</sub> -Az <sub>۹</sub> -Az <sub>۱۰</sub> -Az <sub>۱۱</sub> -Az <sub>۱۲</sub> -Az <sub>۱۳</sub> -Az <sub>۱۴</sub> -Az <sub>۱۵</sub> -Az <sub>۱۶</sub> -Az <sub>۱۷</sub> -Az <sub>۱۸</sub> -Az <sub>۱۹</sub> -Az <sub>۲۰</sub> -Az <sub>۲۱</sub> -Az <sub>۲۲</sub> -Az <sub>۲۳</sub> -Az <sub>۲۴</sub> -Az <sub>۲۵</sub> -Az <sub>۲۶</sub> -Az <sub>۲۷</sub> -Az <sub>۲۸</sub> -Az <sub>۲۹</sub> -Az <sub>۳۰</sub> -Az <sub>۳۱</sub> -Az <sub>۳۲</sub> -Az <sub>۳۳</sub> -Az <sub>۳۴</sub> -Az <sub>۳۵</sub> -Az <sub>۳۶</sub> -Az <sub>۳۷</sub> -Az <sub>۳۸</sub> -Az <sub>۳۹</sub> -Az <sub>۴۰</sub> -Az <sub>۴۱</sub> -Az <sub>۴۲</sub> -Az <sub>۴۳</sub> -Az <sub>۴۴</sub> -Az <sub>۴۵</sub> -Az <sub>۴۶</sub> -Az <sub>۴۷</sub> -Az <sub>۴۸</sub> -Az <sub>۴۹</sub> -Az <sub>۵۰</sub> -Az <sub>۵۱</sub> -Az <sub>۵۲</sub> -Az <sub>۵۳</sub> -Az <sub>۵۴</sub> -Az <sub>۵۵</sub> -Az <sub>۵۶</sub> -Az <sub>۵۷</sub> -Az <sub>۵۸</sub> -Az <sub>۵۹</sub> -Az <sub>۶۰</sub> -Az <sub>۶۱</sub> -Az <sub>۶۲</sub> -Az <sub>۶۳</sub> -Az <sub>۶۴</sub> -Az <sub>۶۵</sub> -Az <sub>۶۶</sub> -Az <sub>۶۷</sub> -Az <sub>۶۸</sub> -Az <sub>۶۹</sub> -Az <sub>۷۰</sub> -Az <sub>۷۱</sub> -Az <sub>۷۲</sub> -Az <sub>۷۳</sub> -Az <sub>۷۴</sub> -Az <sub>۷۵</sub> -Az <sub>۷۶</sub> -Az <sub>۷۷</sub> -Az <sub>۷۸</sub> -Az <sub>۷۹</sub> -Az <sub>۸۰</sub> -Az <sub>۸۱</sub> -Az <sub>۸۲</sub> -Az <sub>۸۳</sub> -Az <sub>۸۴</sub> -Az <sub>۸۵</sub> -Az <sub>۸۶</sub> -Az <sub>۸۷</sub> -Az <sub>۸۸</sub> -Az <sub>۸۹</sub> -Az <sub>۹۰</sub> -Az <sub>۹۱</sub> -Az <sub>۹۲</sub> -Az <sub>۹۳</sub> -Az <sub>۹۴</sub> -Az <sub>۹۵</sub> -Az <sub>۹۶</sub> -Az <sub>۹۷</sub> -Az <sub>۹۸</sub> -Az <sub>۹۹</sub> -Az <sub>۱۰۰</sub>	۳۵	+	-	+	<i>A. chroococcum</i>
Az <sub>۱</sub> -Az <sub>۲</sub> -Az <sub>۳</sub> -Az <sub>۴</sub> -Az <sub>۵</sub> -Az <sub>۶</sub> -Az <sub>۷</sub> -Az <sub>۸</sub> -Az <sub>۹</sub> -Az <sub>۱۰</sub> -Az <sub>۱۱</sub> -Az <sub>۱۲</sub> -Az <sub>۱۳</sub> -Az <sub>۱۴</sub> -Az <sub>۱۵</sub> -Az <sub>۱۶</sub> -Az <sub>۱۷</sub> -Az <sub>۱۸</sub> -Az <sub>۱۹</sub> -Az <sub>۲۰</sub> -Az <sub>۲۱</sub> -Az <sub>۲۲</sub> -Az <sub>۲۳</sub> -Az <sub>۲۴</sub> -Az <sub>۲۵</sub> -Az <sub>۲۶</sub> -Az <sub>۲۷</sub> -Az <sub>۲۸</sub> -Az <sub>۲۹</sub> -Az <sub>۳۰</sub> -Az <sub>۳۱</sub> -Az <sub>۳۲</sub> -Az <sub>۳۳</sub> -Az <sub>۳۴</sub> -Az <sub>۳۵</sub> -Az <sub>۳۶</sub> -Az <sub>۳۷</sub> -Az <sub>۳۸</sub> -Az <sub>۳۹</sub> -Az <sub>۴۰</sub> -Az <sub>۴۱</sub> -Az <sub>۴۲</sub> -Az <sub>۴۳</sub> -Az <sub>۴۴</sub> -Az <sub>۴۵</sub> -Az <sub>۴۶</sub> -Az <sub>۴۷</sub> -Az <sub>۴۸</sub> -Az <sub>۴۹</sub> -Az <sub>۵۰</sub> -Az <sub>۵۱</sub> -Az <sub>۵۲</sub> -Az <sub>۵۳</sub> -Az <sub>۵۴</sub> -Az <sub>۵۵</sub> -Az <sub>۵۶</sub> -Az <sub>۵۷</sub> -Az <sub>۵۸</sub> -Az <sub>۵۹</sub> -Az <sub>۶۰</sub> -Az <sub>۶۱</sub> -Az <sub>۶۲</sub> -Az <sub>۶۳</sub> -Az <sub>۶۴</sub> -Az <sub>۶۵</sub> -Az <sub>۶۶</sub> -Az <sub>۶۷</sub> -Az <sub>۶۸</sub> -Az <sub>۶۹</sub> -Az <sub>۷۰</sub> -Az <sub>۷۱</sub> -Az <sub>۷۲</sub> -Az <sub>۷۳</sub> -Az <sub>۷۴</sub> -Az <sub>۷۵</sub> -Az <sub>۷۶</sub> -Az <sub>۷۷</sub> -Az <sub>۷۸</sub> -Az <sub>۷۹</sub> -Az <sub>۸۰</sub> -Az <sub>۸۱</sub> -Az <sub>۸۲</sub> -Az <sub>۸۳</sub> -Az <sub>۸۴</sub> -Az <sub>۸۵</sub> -Az <sub>۸۶</sub> -Az <sub>۸۷</sub> -Az <sub>۸۸</sub> -Az <sub>۸۹</sub> -Az <sub>۹۰</sub> -Az <sub>۹۱</sub> -Az <sub>۹۲</sub> -Az <sub>۹۳</sub> -Az <sub>۹۴</sub> -Az <sub>۹۵</sub> -Az <sub>۹۶</sub> -Az <sub>۹۷</sub> -Az <sub>۹۸</sub> -Az <sub>۹۹</sub> -Az <sub>۱۰۰</sub>	۱۴	+	+	+	<i>A. vinelandii</i>
Az <sub>۱</sub> -Az <sub>۲</sub> -Az <sub>۳</sub> -Az <sub>۴</sub> -Az <sub>۵</sub> -Az <sub>۶</sub> -Az <sub>۷</sub> -Az <sub>۸</sub> -Az <sub>۹</sub> -Az <sub>۱۰</sub> -Az <sub>۱۱</sub> -Az <sub>۱۲</sub> -Az <sub>۱۳</sub> -Az <sub>۱۴</sub> -Az <sub>۱۵</sub> -Az <sub>۱۶</sub> -Az <sub>۱۷</sub> -Az <sub>۱۸</sub> -Az <sub>۱۹</sub> -Az <sub>۲۰</sub> -Az <sub>۲۱</sub> -Az <sub>۲۲</sub> -Az <sub>۲۳</sub> -Az <sub>۲۴</sub> -Az <sub>۲۵</sub> -Az <sub>۲۶</sub> -Az <sub>۲۷</sub> -Az <sub>۲۸</sub> -Az <sub>۲۹</sub> -Az <sub>۳۰</sub> -Az <sub>۳۱</sub> -Az <sub>۳۲</sub> -Az <sub>۳۳</sub> -Az <sub>۳۴</sub> -Az <sub>۳۵</sub> -Az <sub>۳۶</sub> -Az <sub>۳۷</sub> -Az <sub>۳۸</sub> -Az <sub>۳۹</sub> -Az <sub>۴۰</sub> -Az <sub>۴۱</sub> -Az <sub>۴۲</sub> -Az <sub>۴۳</sub> -Az <sub>۴۴</sub> -Az <sub>۴۵</sub> -Az <sub>۴۶</sub> -Az <sub>۴۷</sub> -Az <sub>۴۸</sub> -Az <sub>۴۹</sub> -Az <sub>۵۰</sub> -Az <sub>۵۱</sub> -Az <sub>۵۲</sub> -Az <sub>۵۳</sub> -Az <sub>۵۴</sub> -Az <sub>۵۵</sub> -Az <sub>۵۶</sub> -Az <sub>۵۷</sub> -Az <sub>۵۸</sub> -Az <sub>۵۹</sub> -Az <sub>۶۰</sub> -Az <sub>۶۱</sub> -Az <sub>۶۲</sub> -Az <sub>۶۳</sub> -Az <sub>۶۴</sub> -Az <sub>۶۵</sub> -Az <sub>۶۶</sub> -Az <sub>۶۷</sub> -Az <sub>۶۸</sub> -Az <sub>۶۹</sub> -Az <sub>۷۰</sub> -Az <sub>۷۱</sub> -Az <sub>۷۲</sub> -Az <sub>۷۳</sub> -Az <sub>۷۴</sub> -Az <sub>۷۵</sub> -Az <sub>۷۶</sub> -Az <sub>۷۷</sub> -Az <sub>۷۸</sub> -Az <sub>۷۹</sub> -Az <sub>۸۰</sub> -Az <sub>۸۱</sub> -Az <sub>۸۲</sub> -Az <sub>۸۳</sub> -Az <sub>۸۴</sub> -Az <sub>۸۵</sub> -Az <sub>۸۶</sub> -Az <sub>۸۷</sub> -Az <sub>۸۸</sub> -Az <sub>۸۹</sub> -Az <sub>۹۰</sub> -Az <sub>۹۱</sub> -Az <sub>۹۲</sub> -Az <sub>۹۳</sub> -Az <sub>۹۴</sub> -Az <sub>۹۵</sub> -Az <sub>۹۶</sub> -Az <sub>۹۷</sub> -Az <sub>۹۸</sub> -Az <sub>۹۹</sub> -Az <sub>۱۰۰</sub>	۴	-	-	-	<i>A. armeniacus</i>

در بین ۲۳ جدایه *ازتوباکتر* مورد بررسی ۸۲/۶ درصد جدایه‌ها توان تثبیت نیتروژن مولکولی را از خود نشان دادند یا به‌عبارت بهتر میزان احیاء استیلن در ۸۲/۶ درصد جدایه‌ها به روش GC قابل اندازه‌گیری بود. بیش‌ترین میزان احیاء استیلن به اتیلن در جدایه Az<sub>۲۶</sub> و به‌میزان ۴۲۸/۲۳ نانومول اتیلن در لوله بر ساعت و کم‌ترین آن در جدایه Az<sub>۱</sub> (۰/۰۲ نانومول اتیلن در لوله بر ساعت) مشاهده شد. رجایی و همکاران (۲۰۰۷) توانایی تثبیت بیولوژیک نیتروژن مولکولی را در ۶۳ جدایه *Azotobacter* مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهش نشان داد که ۳۴ جدایه از این ۶۳ جدایه این توانایی را داشتند و بالاترین میزان آن ۸/۳ نانومول اتیلن بر ساعت گزارش نمودند.

از بین ۲۳ جدایه بررسی شده در این آزمون بیش‌ترین میزان تولید IAA متعلق به جدایه Az<sub>۴</sub> و به‌میزان ۲۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر بود و کم‌ترین میزان آن ۰/۰۱۵۷ در Az<sub>۲۰</sub> مشاهده شد. میزان تولید IAA و اتیلن در این جدایه‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است. یاسمین و همکاران میزان تولید IAA

توسط جدایه‌هایی از *ازتوباکتر*، *آزوسپیریلیوم* و *باسیلیوس* را با روش HPLC اندازه‌گیری نمودند و بیش‌ترین مقدار تولید IAA را برای بعضی جدایه‌های *ازتوباکتر* ( $90/8 \pm 10$  میلی‌گرم بر لیتر) به‌دست آوردند. رویو و همکاران (۲۰۰۰) حداکثر مقدار تولید IAA را در سویه‌های *ازتوباکتر* *کروکوکوم* در فاز ایستایی رشد گزارش نمودند.

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

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس میزان اکسین تولید شده و نیتروژن تثبیت شده در جدایه‌های *ازتوباکتر*.

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
میزان نیتروژن تثبیت شده (نانومتر در ویال بر هکتار)	غلظت اکسین تولید شده (میلی‌گرم بر لیتر)	
۷۸۴۷/۵۷	۰/۰۰۰۱	تکرار
۴۳۶۱۴/۱۵	۱۰۰/۰۴۹**	جدایه باکتری
۴۷۱۱/۸	۰/۰۰۰۱	خطا
۱۴	۰/۲۵	ضریب تغییرات

نتایج به‌دست آمده از ارزیابی تولید سیدروفور نشان داد که ۱۹ جدایه از ۲۳ جدایه مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور را داشتند. نسبت قطر هاله به کلنی در ۷۲ ساعت بین ۶/۳۶-۲/۱۵ متغیر بود و ۸۲/۶۱ درصد جدایه‌ها این توانایی را دارا بودند. با توجه به یکسان بودن مقدار مایه تلقیح نسبت قطر هاله به کلنی می‌تواند معیار مناسبی برای مقایسه تولید سیدروفور بین جدایه‌ها باشد. بیش‌ترین میزان تولید سیدروفور در جدایه AZ<sub>۲۶</sub> با نسبت قطر هاله بر کلنی ۶/۳۶ در مدت ۷۲ ساعت مشاهده شد. رجایی و همکاران (۲۰۰۷) توانایی تولید سیدروفور را در جدایه‌های *Azotobacter* مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهش نشان داد که از بین تمام جدایه‌ها تنها ۱۲ درصد آن‌ها در محیط کشت انتخابی Cas-Agar قادر به رشد نبودند و از بین ۸۷ درصد جدایه‌های رشدیافته بر روی محیط، بیش از ۹۰ درصد آن‌ها قابلیت تولید سیدروفورها را از خود نشان دادند.

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

شماره ایزوله	گونه	غلظت اکسین (میلی‌گرم بر لیتر)	میزان نیتروژن تثبیت شده
		بعد از ۴۸ ساعت	(نانومتر در ویال بر هکتار)
AZ <sub>۱</sub>	<i>A. vinelandii</i>	۹/۸۹۱ <sup>e</sup>	۳۶/۶ <sup>ef</sup>
AZ <sub>۲</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۶/۳۲۷۱ <sup>g</sup>	۱۷۵/۰۱ <sup>cdef</sup>
AZ <sub>۴</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲۷/۳۰۲۳ <sup>a</sup>	-
AZ <sub>۶</sub>	<i>A. vinelandii</i>	۴/۰۰۳۵ <sup>h</sup>	۱۸۳/۹۲ <sup>cde</sup>
AZ <sub>۷</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۰/۷۵۳۶ <sup>m</sup>	۳۸/۷ <sup>ef</sup>
AZ <sub>۸</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۶/۲۶۴۳ <sup>g</sup>	۲۶/۰۵ <sup>ef</sup>
AZ <sub>۹</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۰/۲۳۵۵ <sup>n</sup>	۲۸۰/۱ <sup>bc</sup>
AZ <sub>۱۰</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲/۳۰۷۹ <sup>k</sup>	۱۷۹/۰۹ <sup>cdef</sup>
AZ <sub>۱۱</sub>	<i>A. vinelandii</i>	۰/۸۹۴۹ <sup>m</sup>	۲۷۵/۵۱ <sup>bc</sup>
AZ <sub>۱۲</sub>	<i>A. armeniacus</i>	۲/۷ <sup>j</sup>	۴۳۹/۷۹ <sup>a</sup>
AZ <sub>۱۵</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۴/۰۱۹۲ <sup>h</sup>	۲۱۷/۸۸ <sup>cd</sup>
AZ <sub>۱۶</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۳/۶۱۱ <sup>i</sup>	-
AZ <sub>۱۷</sub>	<i>A. armeniacus</i>	۲/۰۸۸۱ <sup>l</sup>	۱۸۵/۶ <sup>cde</sup>
AZ <sub>۲۰</sub>	<i>A. vinelandii</i>	۰/۰۱۵۷ <sup>o</sup>	۱۰۶/۰۸ <sup>def</sup>
AZ <sub>۲۱</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲/۶۵۳۳ <sup>j</sup>	-
AZ <sub>۲۲</sub>	<i>A. armeniacus</i>	۲/۱۶۶۶ <sup>l</sup>	۲۵۴/۶۱ <sup>bcd</sup>
AZ <sub>۲۵</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۱۰/۹۴۲۹ <sup>d</sup>	۳۶۷/۰۹ <sup>ab</sup>
AZ <sub>۲۶</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲۲/۰۴۲۸ <sup>b</sup>	۴۳۲/۰۷ <sup>a</sup>
AZ <sub>۲۷</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۱۱/۷۲۷۹ <sup>c</sup>	۲۱/۳۹ <sup>f</sup>
AZ <sub>۳۷</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۰/۰۹۴۳ <sup>n</sup>	۱۰۷/۸۳ <sup>def</sup>
AZ <sub>۴۴</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۹/۰۱۲ <sup>f</sup>	-
AZ <sub>۴۹</sub>	<i>A. vinelandii</i>	۰/۱۵۷ <sup>n</sup>	۱۱۶/۳۹ <sup>def</sup>
AZ <sub>۵۱</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲۳/۵۰۲۹ <sup>b</sup>	-

\* حروف مشترک نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۶- طبقه‌بندی سویه‌های ازتوباکتر براساس نسبت قطر هاله بر کلنی در محیط کشت Cas-Agar.

کلاس	نسبت قطر هاله بر کلنی	فراوانی (درصد)
D	۰	۲۹/۶۳
C	۰/۵-۲	۲۹/۶۳
B	۲-۴	۲۹/۶۳
A	>۴	۱۱/۱۱

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

شماره ایزوله	گونه	نسبت قطر هاله به کلنی		
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
Az <sub>۱</sub>	<i>A. vinelandii</i>	۳/۳۲۴	۲/۵۸	۲/۲۹
Az <sub>۲</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲/۰۷	۲/۳	۲/۳۲۵
Az <sub>۳</sub>	<i>A. chroococcum</i>	-	-	-
Az <sub>۴</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲/۰۶۴	۲/۵۵	۲/۶۷
Az <sub>۵</sub>	<i>A. armeniacus</i>	۲/۰۸	۲/۱۵	۲/۳۶
Az <sub>۶</sub>	<i>A. vinelandii</i>	۱/۹۹	۱/۲	۲/۴۷
Az <sub>۷</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۱/۹۲	۲/۵۳	۲/۷۳
Az <sub>۸</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۱/۷۴	۲/۵۵	۳/۰۳
Az <sub>۹</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲/۹۸	۳/۴۱	۳/۶۳
Az <sub>۱۰</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲/۷۹	۴/۸۶	۶/۱۴
Az <sub>۱۱</sub>	<i>A. vinelandii</i>	۲/۶۳	۳/۰۲	۳/۳۲
Az <sub>۱۲</sub>	<i>A. armeniacus</i>	۳/۰۱	۵/۰۴	۵/۹۶
Az <sub>۱۳</sub>	<i>A. chroococcum</i>	-	۱/۳	۲/۲۸
Az <sub>۱۴</sub>	<i>A. chroococcum</i>	-	۱/۹۸	۲/۳۴
Az <sub>۱۵</sub>	<i>A. chroococcum</i>	-	۲/۱۴	۲/۳۶
Az <sub>۱۶</sub>	<i>A. chroococcum</i>	-	-	۲/۴۱
Az <sub>۱۷</sub>	<i>A. armeniacus</i>	-	۲/۲۳	۲/۳۶
Az <sub>۱۸</sub>	<i>A. chroococcum</i>	-	۱/۸۲	۲/۲۴
Az <sub>۱۹</sub>	<i>A. chroococcum</i>	-	۲/۲۳	۲/۷۲
Az <sub>۲۰</sub>	<i>A. vinelandii</i>	-	-	-
Az <sub>۲۱</sub>	<i>A. chroococcum</i>	-	-	-
Az <sub>۲۲</sub>	<i>A. armeniacus</i>	-	-	-
Az <sub>۲۳</sub>	<i>A. chroococcum</i>	۲/۵۲	۴/۸	۶/۳۶

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

#### منابع

- 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.
- Becking, J.H. 2006. The family *Azotobacteraceae*. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (eds.). *The prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> edn. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, Springer, Berlin Heidelberg New York, 4: 3144-3170.
- 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.
- Kader, M.A., Main, M.H., and Hoque, M.S. 2002. Effects of *Azotobacter* inoculant on the yield and nitrogen up take by wheat, *J. Biol. Sci.* 2: 259-261.
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., and Keeskes, M.L. 2004. Non-symbiotic bacteria diazotrophs in crop-farming system: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology and Biochemistry.* 16: 120-131.
- Krieg, N.R. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins.
- Kumar, V., and Narula, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphate and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants, *Biol. Fertil. Soils.* 28: 301-305.
- Lynch, J.M. 1990. *The Rhizosphere*. John Wiley and Sons Ltd. Chicheseter. England, 300p.
- Mrkovacki, N., and Milic, V. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potential useful in agricultural application, *Ann Microbiol.* 51: 145-158.

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



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

**\*S. Dolati<sup>1</sup>, M. Olamaee<sup>2</sup>, M. Barani Motlagh<sup>2</sup> and A.M. Nouryrad Davaji<sup>3</sup>**

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

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

### **Abstract**

*Azotobacter* is an important bacteria in crop rhizosphere. This research aimed the isolation of local *Azotobacter* under cultivation of soybean plant in Golestan province and their potential growth promoting-ability. After identification of 30 isolates their ability to molecular nitrogen fixation were tested with Acetylene to Ethylene reduction method. Their ability in auxin production and solubilizing the mineral P were tested with colorimetric method and siderophore production potential was tested with Cas-agar medium. The maximum nitrogen fixation was in Az<sub>26</sub> (428.23 nm.vial.h<sup>-1</sup> ethylene) and minimum in Az<sub>27</sub> (21.39 nm.vial.h<sup>-1</sup> ethylene). Auxin production was highest in Az<sub>4</sub> isolate (27.3 mg/l) and lowest in Az<sub>20</sub> isolate (0.0157 mg/l). Also maximum siderophore production was in Az<sub>9</sub> and minimum in Az<sub>18</sub> observed with diameter halo on colony of 6.36 and 2.24 in 72 hours respectively.

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

---

\* Corresponding Authors; Email: [soodabe.dolati@gmail.com](mailto:soodabe.dolati@gmail.com)

