نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد ششم، شماره اول، ۱۳۹۵
http://ejsms.gau.ac.ir

ارزیابی صفات محرک رشدی برخی از جدایه‌های باکتری *ازتوباکتر* بومی خاک‌های استان گلستان

*افشین بهروز[۱]، محسن علمائی[۲]، سیدعلیرضا موحدی‌نائینی[۲] و رضا قربانی نصرآبادی[۳]
[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]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 ازتوباکتر می‌باشد. این باکتری به‌طور مستقیم و غیرمستقیم پارامترهای رشد گیاه را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. این پژوهش با هدف جمع‌آوری جدایه‌های مختلف ازتوباکتر 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 اسپربر 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 ازتوباکتر 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

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 ثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفات و پتاسیم، توانایی تولید سیدروفور و اکسین در جدایه‌های مختلفی به‌دست آمد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در جدای‌های مختلف ازتوباکتر، به‌نظر 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 قابل‌توجه ذخایر انرژی کره زمین نظیر سوخت‌های فسیلی)، امنیت غذایی کشورهای مختلف و به‌خصوص کشورهای در حال توسعه تحت‌تأثیر 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

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 وینوگرادسکی 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 سوسپانسیون به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت انتخابی وینوگرادسکی مایع فاقد نیتروژن اضافه شد. محیط وینوگرادسکی شامل ۵۰ میلی‌لیتر محلول غلیظ وینوگرادسکی که بر حسب گرم در لیتر شامل: (۵/۰ K_2HPO_4، ۲/۵ $MgSO_4.7H_2O$، ۲/۵ NaCl، ۰/۰۵ $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۵ $MnSO_4.4H_2O$، pH=۷/۳)، ۱ میلی‌لیتر محلول عناصر کم‌مصرف بر حسب گرم در لیتر شامل: (۰/۰۵ $Co(NO_3)_2.6H_2O$، ۰/۰۵ $CuSO_4.5H_2O$، ۰/۰۵ $ZnSO_4$، ۰/۰۵ $K_2MoO_4.2H_2O$)، ۱۰ گرم مانیتول، ۰/۵ گرم کربنات کلسیم و ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر است. این سوسپانسیون جدید به‌مدت 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 وینوگرادسکی جامد به‌منظور خالص‌سازی کشت داده و پس از چند مرحله واکشت کلنی‌های تیپیک بر روی محیط کشت انتخابی وینوگرادسکی 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 سیست 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).

جدول ١- تست‌های انجام شده جهت شناسایی باکتری‌های ازتوباکتر.

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

تست‌های انجام شده The performed tests	باکتری *ازتوباکتر* *Azotobacter* bacteria
محیط کشت وینوگرادسکی Vinogradsky medium	با اینکه این محیط فاقد نیتروژن است باکتری رشد می‌کند The medium has not nitrogen, though the bacteria grows
کشت کهنه Old culture	تشکیل سیست به رنگ زرد و قهوه‌ای تا مایل به سیاه Formation yellow and brown cyst to blackish
آزمون گرم Gram test	گرم منفی Negative- gram
آزمون اکسیداز Oxidase test	توانایی تولید آنزیم سیتوکروم اکسیداز به‌صورت تغییر رنگ کلنی به بنفش تیره در اثر تماس با معرف 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 ٣ 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

اندازه‌گیری کمی توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی: به‌منظور بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکول از روش احیاء استیلن (ARA)[1] و دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC[2]) استفاده شد. در ابتدا در درون لوله‌های آزمایش در پوش دار ١٥ میلی‌لیتری مقدار ٥ میلی‌لیتر محیط کشت مایع فاقد نیتروژن وینوگرادسکی ریخته و استریل گردید. پس از سرد شدن کامل محیط و رسیدن آن به دمای مطلوب رشد باکتری ١٠٠ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی تازه به هر لوله اضافه گردید، پس از ۴٨ ساعت انکوباسیون، درب پنبه‌ای لوله‌ها با درب‌های پلاستیکی استریل تعویض شد و ١٠ درصد حجم هوای داخل هر لوله (٠/٧ میلی‌لیتر بدون احتساب حجم لاستیک) به‌وسیله سرنگ تخلیه و به همان میزان گاز استیلن به لوله‌ها تزریق گردید. درزهای درپوش‌های لاستیکی با پارافیلم پوشانده شد و پس از ٢۴ ساعت انکوباسیون مجدد ٠/٧ میکرولیتر از هوای داخل لوله با استفاده از سرنگ هامیلتون به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GOW_MAC) تزریق گردید و سطح زیر منحنی ایجادشده قرائت شد. البته قبل از قرائت نمونه‌های باکتری، دستگاه با غلظت‌های مختلف اتیلن کالیبره و منحنی کالیبراسیون رسم گردید (١٧).

اندازه‌گیری کمی توان حل فسفات معدنی: قبل از انجام آزمایش، ارلن‌ها و تمام وسایل شیشه‌ای مورد نیاز با آب دی‌یونیزه شسته شده و به‌مدت ٢ ساعت در دمای ١٨٠ درجه سانتی‌گراد داخل آون قرار داده شدند. از کشت تازه باکتری به‌وسیله لوپ فلزی کلونی باکتری به ٢٥ میلی‌لیتر محیط وینوگرادسکی مایع تلقیح و پس از سپری شدن ۴٨ ساعت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تازه میکروبی به ٢٥ میلی‌لیتر محیط اسپربر (که بر حسب گرم در لیتر شامل: ١٠ Glucose، ٠/٥ Yeast extract، ٠/١ $CaCl_2$، ٠/٢ $MgSO_4.7H_2O$، ٥ $Ca_3(PO_4)_2$) افزوده و با سرعت ١٢٠ دور در دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در زمان‌های ٢۴، ۴٨ و ٧٢ ساعت، ٢ میلی‌لیتر از

1- Acetylene reduction assay
2- Gas chromatography

سوسپانسیون داخل اپندورف ریخته شد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و ۱ میلی‌لیتر از محلول بالایی با ۱ میلی‌لیتر معرف آمونیم مولیبدات وانادات و ۳ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه مخلوط گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرارگرفته 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 تهیه‌شده توسط مقادیر مختلف KH_2PO_4 محاسبه گردید. برای ترسیم منحنی استاندارد ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر KH_2PO_4 با ۳ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه و ۱ میلی‌لیتر معرف آمونیم مولیبدات-وانادات مخلوط و سپس میزان جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۱۱).

اندازه‌گیری کمی حلالیت پتاسیم معدنی: از کشت تازه باکتری به‌وسیله لوپ فلزی کلونی باکتری، به ۲۵ میلی‌لیتر محیط وینوگرادسکی مایع تلقیح و پس از سپری شدن ۴۸ ساعت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تازه میکروبی به ۲۵ میلی‌لیتر محیط الکساندروف (این محیط بر حسب گرم در لیتر شامل: ۵ Sucrose، ۰/۵ $MgSO_4$، ۰/۱ $CaCO_3$، ۰/۰۰۵ $FeCl_3$، ۰/۰۰۲ H_2MoO_4، ۵ Muscovite، pH=۷) افزوده و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت، ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و در محلول رویی آن به‌وسیله دستگاه شعله‌سنج (فلم‌فتومتر) غلظت پتاسیم اندازه‌گیری شد (۲۰).

اندازه‌گیری کمی توان تولید هورمون اکسین (IAA): برای اندازه‌گیری کمی توانایی تولید هورمون اکسین محیط کشت مایع LB-T[1] که دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر L-Tryptophan به‌عنوان پیش‌ماده تولید اکسین (بر حسب گرم در لیتر شامل: ۱۰ Trypton، ۵ Yeast Extract، ۵ NaCl) است، تهیه و به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر در درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری توزیع و استریل گردید و ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی تازه به درون هر ارلن تلقیح گردید. درب ارلن‌ها با پنبه استریل و فویل آلومینیومی استریل مسدود و جداره بیرونی ارلن‌ها 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 سانتی‌گراد قرار داده شدند. در زمان‌های ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های درون هر ارلن برداشته و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول شفاف رویی به آرامی جدا و یک میلی‌لیتر از این محلول به ۲ میلی‌لیتر معرف سالکووسکی (شامل ۹۸ میلی‌لیتر اسیدپرکلریک ۳۵٪، ۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ مولار $FeCl_3.6H_2O$) افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند و در نهایت شدت رنگ تولیدشده 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، غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر IAA تهیه و یک حجم از این محلول با دو حجم از معرف سالکووسکی مخلوط و خوب به‌هم‌خورده شد. پس از ۲۰ دقیقه در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت انجام شد (۱۹).

1- LB-Tryptophan (Luria-Bertani)

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 کازآمینواسید 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[1] (که بر حسب گرم در لیتر شامل: ۵ Soy flour diagested with pepsin enzyme، ۱۵ Hydrolize casein، ۵ NaCl، ۱۵ Agar) غنی شده با گلایسین (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 پارافیلم 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

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 ملکولی در *ازتوباکتر* ثابت شده و این باکتری از دیرباز به‌عنوان یک تثبیت‌کننده نیتروژن ملکولی 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

توسط روش احیاء استیلن و کروماتوگرافی گازی برای مقادیر بالای تثبیت نیتروژن و یا به‌عبارتی فعالیت بالای آنزیم نیتروژناز مناسب است؛ در حالی‌که 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 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).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس.

Table 2. The results of variance analysis.

منابع تغییر Source variation	فسفر Phosphorus			پتاسیم Potassium		اکسین Auxin	تثبیت نیتروژن مولکولی Molecular nitrogen fixation			سیدروفور Siderophore
	میانگین مربعات									
ساعت قرائت Reading time	۲۴ ساعت 24 hour	۴۸ ساعت 48 hour	۷۲ ساعت 72 hour	۷۲ ساعت 72 hour	۹۶ ساعت 96 hour	۷۲ ساعت 72 hour	۹۶ ساعت 96 hour	۱۲۰ ساعت 120 hour	۲۴ ساعت 24 hour	۹۶ ساعت 96 hour
باکتری Bacteria	23801**	24322**	22660**	134**	135**	1461**	1848**	1588**	9268**	4.3**
خطا Error	1.0	0.58	0.66	0.30	0.41	0.004	0.003	0.002	0.006	0.04
ضریب تغییرات (٪) Change variation	1.1	0.74	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 تثبیت‌شده در مدت زمان ۲٤ ساعت.

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

شماره جدایه Isolate number	قرائت در ۲۴ ساعت Reading at 24 hour (nMC_2H_4/h.vial)	شماره جدایه Isolate number	قرائت در ۲۴ ساعت Reading at 24 hour (nMC_2H_4/h.vial)	شماره جدایه Isolate number	قرائت در ۲۴ ساعت Reading at 24 hour (nMC_2H_4/h.vial)	شماره جدایه Isolate number	قرائت در ۲۴ ساعت Reading at 24 hour (nMC_2H_4/h.vial)
1	227 b	12	82.7 C	23	169 e	34	60.7 L
2	140 h	13	137 j	24	104 s	35	137 i
3	276 a	14	119 n	25	153 g	36	71.9 G
4	0	15	107 r	26	111 p	37	93.5 y
5	0	16	98.8 v	27	80.9 D	38	79.9 E
6	54.5 M	17	79.3 F	28	70.4 H	39	85.2 B
7	123 m	18	95.2 w	29	92.9 z	40	66.6 J
8	126 k	19	162 f	30	176 d	41	98.8 u
9	124 l	20	186 c	31	109 q	42	68.4 I
10	0 N	21	93.9 x	32	66.0 K	43	85.5 A
11	115 o	22	103 t	33	0		

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار.

The same alphabet shows non-significant difference.

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 را هم می‌تواند به گیاه 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 فسفاته (مینرالوژی و ترکیب شیمیایی منبع فسفاته)، سایر عناصر مانند فلزات سنگین و نوع محیط کشت اشاره نمود. تمامی این عوامل قادر هستند پتانسیل انحلال فسفات در میکروارگانیسم‌ها را تحت‌تأثیر قرار دهند (۱۸).

جدول ٤- میانگین مقدار انحلال فسفر در زمان های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت.

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

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

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

The same alphabet shows non-significant difference.

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 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).

جدول ۵- میانگین مقدار انحلال پتاسیم حل‌شده 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 i	47.3 a	23	12.9 n	21.5 j	1
28.0 g	25.8 h	24	19.4 k	23.7 i	2
25.9 h	28.0 g	25	30.2 f	30.1 f	3
28.0 g	32.3 e	26	30.2 f	25.8 h	4
25.9 h	32.3 e	27	28.0 g	28.0 g	5
28.0 g	28.0 g	28	32.4 e	28.0 g	6
21.6 j	15.0 l	29	30.2 f	32.3 e	7
30.2 f	25.8 h	30	34.5 d	25.8 h	8
25.9 h	23.7 i	31	36.7 c	28.0 g	9
30.2 f	25.8 h	32	32.4 e	28.0 g	10
17.2 l	12.9 m	33	25.9 h	28.0 g	11
25.9 h	30.1 f	34	23.7 i	23.7 i	12
32.41 e	36.6 c	35	41.0 a	40.9 b	13
25.93 h	30.1 f	36	30.2 f	23.7 i	14
38.89 b	32.3 e	37	15.1 m	15.0 l	15
38.89 b	32.3 e	38	28.0 g	21.5 j	16
23.77 i	28.0 g	39	21.6 j	30.1 f	17
19.45 k	19.3 k	40	28.0 g	25.8 h	18
30.25 f	25.8 h	41	28.0 g	25/8 h	19
21.61 j	23.7 i	42	23.7 i	25.8 h	20
10.80 o	10.7 n	43	36.7 c	28.0 g	21
			34.5 d	34.4 d	22

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

The same alphabet shows non-significant difference.

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 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

میزان انحلال مربوط به جدایه شماره ١٧ 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 (٢٠٠٥) هنگامی که به محیط کشت *ازتوباکتر* تریپتوفان اضافه شود، این باکتری هورمون اکسین تولید می‌کند (١). یاسمین و همکاران (٢٠٠۴) میزان تولید اکسین توسط جدایه‌هایی از ازتوباکتر، *آزوسپریلوم* و *باسیلوس* را با روش HPLC[1] اندازه‌گیری نمودند و بیش‌ترین مقدار تولید اکسین را برای بعضی جدایه‌های *ازتوباکتر* (mg/l ١٠±٩٠/٨) به‌دست آوردند (٢٧). روبیو و همکاران (٢٠٠٠) در پژوهشی میزان تولید اکسین را در جدایه‌های مختلف *ازتوباکتر*، *سودوموناس* و *اینتروباکتریا* بررسی نموده و حداکثر مقدار تولید اکسین را در جدایه‌های *ازتوباکتر کروکوکوم* و در فاز ایستایی رشد گزارش نمودند (١٩).

جدول ٦- میانگین مقدار اکسین تولید شده در زمان‌های ٧٢، ٩٦ و ١٢٠ ساعت.

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

قرائت در ١٢٠ ساعت Reading at 120 hour	قرائت در ٩۶ ساعت (میلی‌گرم در لیتر) Reading at 96 hour (mg/L)	قرائت در ٧٢ ساعت Reading at 72 hour	شماره جدایه Isolate number	قرائت در ١٢٠ ساعت Reading at 120 hour	قرائت در ٩۶ ساعت (میلی‌گرم در لیتر) Reading at 96 hour (mg/L)	قرائت در ٧٢ ساعت Reading at 72 hour	جدایه‌ها Isolates
0.00^{z}	0.29^{zy}	1.2^{z}	23	3.2^{l}	3.5^{l}	4.7^{ij}	1
0.42^{v}	0.92^{u}	1.3^{yz}	24	0.65^{t}	0.87^{u}	4.4^{k}	2
2.0^{n}	2.5^{m}	4.2^{l}	25	0.22^{x}	0.51^{x}	1.7^{ts}	3
1.2^{r}	1.1^{s}	1.6^{tu}	26	1.5^{q}	1.7^{p}	2.5^{o}	4
2.5^{m}	2.3^{n}	4.1^{m}	27	4.8^{i}	4.5^{i}	4.8^{i}	5
4.1^{k}	3.6^{k}	4.5^{k}	28	1.8^{o}	2.0^{o}	3.7^{n}	6
81.0^{c}	97.2^{b}	85.4^{c}	29	22.1^{d}	6.23^{d}	18.3^{e}	7
0.55^{u}	0.18^{z}	1.5^{xw}	30	0.47^{v}	0.88^{u}	1.9^{r}	8
0.07^{zy}	0.23^{z}	1.2^{z}	31	0.96^{s}	1.0^{t}	1.7^{ts}	9
1.7^{p}	1.3^{r}	1.7^{ts}	32	0.44^{v}	0.62^{wv}	1.9^{r}	10
17.5^{e}	20.0^{e}	20.6^{d}	33	0.32^{w}	0.51^{x}	1.5^{xw}	11
7.5^{g}	5.6^{h}	4.9^{h}	34	0.32^{w}	0.57^{wx}	1.6^{vu}	12
0.18^{x}	0.33^{y}	1.4^{yx}	35	7.9^{f}	8.3^{f}	10.2^{f}	13
1.5^{q}	0.88^{u}	1.6^{vuw}	36	0.23^{x}	0.28^{zy}	1.6^{vuw}	14
95.2^{a}	98.0^{a}	88.7^{b}	37	2.6^{m}	1.8^{p}	2.2^{q}	15
93.7^{b}	96.4^{c}	88.9^{a}	38	0.02^{z}	0.25^{zy}	1.3^{z}	16
0.65^{t}	1.0^{ts}	1.8^{s}	39	0.10^{y}	0.18^{z}	1.3^{z}	17
0.62^{ut}	0.67^{v}	1.43^{yx}	40	0.08^{zy}	0.23^{z}	1.4^{yx}	18
0.05^{zy}	0.21^{z}	1.32^{z}	41	0.23^{x}	0.57^{wx}	1.5^{vw}	19
3.2^{l}	4.0^{j}	4.69^{j}	42	0.05^{zy}	0.28^{zy}	1.7^{ts}	20
4.5^{j}	5.7^{g}	7.25^{g}	43	1.3^{r}	1.5^{q}	2.3^{p}	21
				5.2^{h}	1.0^{t}	1.5^{vw}	22

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار.

The same alphabet shows non-significant difference.

1- High pressure Liquid Chromatography

اندازه‌گیری نیمه‌کمی 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 از۴۳ جدایه مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور را داشتند. متوسط قطر هاله به کلنی در جدایه‌های مختلف *ازتوباکتر* در زمان ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد. جدایه شمارهای 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 به‌دست آمده با نتایج شیوپراساد و پیج (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 رشدیافته بر 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 به‌ترتیب به رنگ نارنجی مایل به قرمز و نارنجی ایجاد می‌کنند، در حالی‌که 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.

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

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

جدایه‌ها Isolates	نسبت قطر هاله به کلنی The ratio of halo diameter to colony	شماره جدایه Isolate number	نسبت قطر هاله به کلنی The ratio of halo diameter to colony	شماره جدایه Isolate number	نسبت قطر هاله به کلنی The ratio of halo diameter to colony	شماره جدایه Isolate number	نسبت قطر هاله به کلنی The ratio of halo diameter to colony
1	**	12	دیده نشد	23	*	34	*
2	*	13	*	24	*	35	*
3	*	14	*	25	**	36	*
4	***	15	**	26	*	37	***
5	*	16	***	27	*	38	***
6	**	17	*	28	*	39	*
7	*	18	***	29	**	40	***
8	*	19	*	30	*	41	***
9	***	20	**	31	***	42	**
10	**	21	*	32	*	43	***
11	22	22	33	33	**		

* 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.

اندازه‌گیری نیمه‌کمی 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 گلایسین 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).

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 ثبیت 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.

منابع

1.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 Tryphtophan. Turk. J. Biol. 82: 29-34.

2.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.

3.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.

4.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.

5.Jinguo, H.U., Seiler, G., and Kole, Ch. 2010. Genetics, genomics and Breeding of sunflower. America, 353p.

6.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 L junggren, H.D. 1984. A comparision between the acethylene 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 qualitativa 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 alication. 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 chrococcum 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 Shanthy, 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 Latinoamrican de Microbioloia. 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+-dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadatation. 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., Mart´ınez-Toledo, M.V., and Gonz´alez-L´opez, J. 2005. isolation and characterization *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugercane 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 benefical effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanibar soils. J. Basic Microbiol. 44: 241-252.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 6(1), 2016
http://ejsms.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

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

***A. Behrooz[1], M. Olamaee[2], S.A.R. Movahedi Naeeni[2] and R. Ghorbani Nasrabadi[3]**

[1]M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]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: Forthy-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