نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۸ شماره ۲صفحه‌های ۲۰۵ تا ۲۱۵/ سال ۱۳۹۷

ارزیابی تثبیت بیولوژیک نیتروژن برخی جدایه‌های *ازتوباکتر* در محیط کشت جامد و مایع LG به روش کجلدال

مهدیه لیلاسی مرند[۱]، محمدرضا ساریخانی[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*** مسئول مکاتبه، پست الکترونیکی:** rsarikhani@yahoo.com

چکیده

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری تثبیت بیولوژیک نیتروژن وجود دارد که عمدتاً شامل سنجش احیا استیلن، بکارگیری نیتروژن نشان‌دار و روش اختلاف نیتروژن می‌باشند. دقت و حساسیت این روش‌ها متفاوت است، ولی مقدور نبودن بعضی از این روش‌ها در همه آزمایشگاه‌ها ایجاب می‌نماید که از روش‌های ساده‌تر برای ارزیابی مقدار تثبیت نیتروژن استفاده نمود، هرچند برخی از این روش‌ها دقت کمتری دارند. در این تحقیق میزان تثبیت نیتروژن تعدادی جدایه باکتری از جمله جنس *ازتوباکتر* به روش کجلدال مورد آزمایش قرار گرفت. تعداد ۲۲ جدایه باکتریایی برای انجام آزمایش استفاده شدند. جدایه‌های مورد آزمون در محیط کشت جامد و مایع LG کشت داده شده و تثبیت نیتروژن در کشت‌های جامد و مایع اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از هضم، تقطیر و تیتراسیون (کجلدال) نمونه‌های رشد یافته بر محیط کشت جامد نشان داد بیش‌ترین میزان تثبیت نیتروژن در جدایه‌های 14SP-III و 14SP2-1 به ترتیب برابر با ۲۶۱/۱۰ و ۲۵۸/۶۴ میکروگرم بر گرم محیط کشت و در ته‌نشست محیط کشت مایع در جدایه 14SP-I، برابر با ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج حاصل از محیط کشت مایع و جامد بیانگر این است که بیش‌ترین میزان نیتروژن در جدایه‌های 14SP-I و 14SP2-1 متعلق به *ازتوباکترکروکوکوم*، *سودوموناس* 35SP-2، و *اکروموباکتر* 14SP-III می‌باشد. نتایج به دست آمده در هر دو محیط کشت جامد و مایع همبستگی بالایی (r=۰/۶۹**) را نشان داد. به نظر می‌رسد، استفاده از این روش برای غربالگری باکتری‌های کارآمد در تثبیت نیتروژن می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد و از میان جدایه‌های مورد آزمون می‌توان سویه‌های 14SP-I، 14SP-III، 14SP2-1، 35SP-2 و 44SP-2 را برای انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: *ازتوباکتر*، تثبیت نیتروژن، روش اختلاف، محیط فاقد نیتروژن

Evaluation of Biological Nitrogen Fixation by *Azotobacter* Isolates in Solid and Liquid LG Medium by Kjeldahl method

M Leylasi Marand[1], MR Sarikhani*[2]

1-MSc Student of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agric., Uni. of Tabriz, Iran
2-Assoc. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agric., Uni. of Tabriz, Iran
*Corresponding Author, Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract
There are different methods for evaluation of the biological nitrogen fixation, which they are mainly included acetylene reduction assay, labeled nitrogen and nitrogen difference methods. Accuracy and sensitivity of these methods are different, but applying of some of these methods isn't possible in all laboratories, so it cause the use of less accurate methods for evaluation of the nitrogen fixing content. Therefore, this article was aimed to investigate the content of nitrogen fixation (NF) of some bacteria isolates including *Azotobacter* using the Kjeldahl method. A total of 22 bacteria isolates were used and evaluated. The isolates were cultured in solid and liquid LG media and the content of the nitrogen fixation was measured in solid and pellet of liquid culture. According to the results of digestion, distillation and titration (Kjeldahl) of the cultured sample in the solid medium, the maximum nitrogen-fixation content 261.10 and 258.64 µg/g were found in 14SP- III and 14SP2-1, respectively. The highest nitrogen-fixation content in liquid culture medium was obtained in 14SP-I (80 µg/ml). The results of liquid and solid culture media indicated that the maximum nitrogen in14SP-I and 14SP2-1 isolates belonged to the *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas* 35SP-2, and *Achromobacter* 14SP- III. The results of NF in both solid and liquid cultures showed a good correlation ($r=0.69^{**}$). It seems that the method can be used for screening the efficient nitrogen fixing bacteria, although this is not so a precise method. 14SP-I, 14SP-III, 14SP2-1, 35SP-2 and 44SP-2 strains can be suggested among the isolates for the greenhouse and farm experiments.

Keywords: *Azotobacter*, Difference method, Nitrogen fixation, Nitrogen free medium

مقدمه

به دلیل هدفی که کشاورزی پایدار دنبال می‌کند، به میکروارگانیسم‌های کارآمد و مفید خاک توجه ویژه‌ای می‌شود و مهم‌ترین مسأله در استفاده حداکثر از مزایای این فناوری، انتخاب سویه موثر PGPR[1] می‌باشد (بی‌نام ۲۰۰۵). شناسایی این پتانسیل میکروبی در خاک و به‌کارگیری آن در قالب کودهای زیستی در کشورهای مختلف به چشم می‌خورد. در ایران نیز در قالب کارهای تحقیقاتی، جداسازی و شناسایی این گروه از باکتری‌ها توسط محققان مختلف انجام شده است اما تعداد محدود و انگشت‌شماری از آن‌ها به صورت کودهای زیستی درآمده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (ساریخانی و مرادی ۱۳۹۴). در کشاورزی امروز، نیتروژن ماده غذایی محدودکننده برای رشد و عملکرد محصولات زراعی است و نیتروژنی که به شکل گازی در هوا وجود دارد برای گیاهان قابل استفاده نیست (دوبرینر ۱۹۹۷، دیکسون و ویلر ۱۹۸۶). این عنصر برای گیاهان از طریق تثبیت زیستی نیتروژن قابل دسترس می‌شود که توسط بعضی از باکتری‌های دی‌آزوتروف انجام می‌گیرد (دوبرینر و بلدانی ۱۹۹۸). از میان باکتری‌های آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن آن‌هایی که متعلق به جنس *ازتوباکتر* هستند، نقش قابل توجهی ایفا می‌کنند و به طور گسترده

[1] Plant growth promoting rhizobacteria

در مکان‌های مختلف مانند خاک، آب و رسوبات پراکنده شده‌اند (پالرونی ۱۹۸۴). *ازتوباکتر* قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی به صورت غیرهمزیست بوده و می‌تواند حداقل ۱۰ میلی‌گرم نیتروژن مولکولی را به ازاء هر گرم از کربوهیدرات مصرفی (معمولاً گلوکز) تثبیت نماید (نارولا و کوپتا ۱۹۸۶).

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن وجود دارد که سنجش احیای استیلن (ARA)[2]، استفاده از ایزوتوپ نشان‌دار (^{15}N) و روش اختلاف مقدار نیتروژن[3] از جمله این روش‌ها می‌باشند (ساریبی ۲۰۰۳، دالتون و کرامر ۲۰۰۶). دقت و حساسیت این روش‌ها متفاوت است و ابراز و دستگاه‌های مورد نیاز برای اندازه‌گیری آنها متفاوت است. روش‌هایی نظیر احیا استیلن یا ایزوتوپ نشاندار دارای حساسیت و دقت بالاتری هستند اما شاید در هر آزمایشگاهی در دسترس نباشند. روش اختلاف نیتروژن که مبتنی بر اندازه‌گیری مقادیر نیتروژن در نمونه‌های مورد آزمایش در مقایسه با شاهد است، نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد که قابلیت انجام آن در مقایسه با روش‌های فوق‌الذکر ساده‌تر و دردسترس‌تر است (بی‌نام ۲۰۰۶). متقی و همکاران (۱۳۸۶) برای سنجش توان تثبیت نیتروژن در سه سویه باکتری *بردی‌رایزوبیوم*، روش رقیق‌سازی ایزوتوپی را که دقیق‌ترین و معتبرترین روش می‌باشد، در همزیستی با دو رقم پرمحصول سویا مورد استفاده قرار دادند. شکری و همکاران (۱۳۹۰) سویه‌های مختلف باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن شامل *آگروباکتریوم*، *بِنی‌باسیلوس*، *ریزوبیوم*، *کلبسیلا اکسیتوکا* و *ازتوباکتر* را از ریشه و خاک اطراف ریشه گیاهان مختلف از جمله نخود، شنبلیله، عدس، یونجه، لوبیا، گندم و برنج جداسازی کردند. سپس از هر کدام ازآن‌ها در دو محیط کشت بدون منبع نیتروژن (ازتوباکتر براث) با دو منبع مختلف قندی شامل مانیتول و ساکاروز کشت دادند و بعد از یک هفته تولید آمونیاک را در آن‌ها توسط معرف نسلر مورد بررسی قرار دادند. در مرحله آخر، تولید آمونیاک در واکنش تثبیت نیتروژن با تولید آمونیاک طی فرایند آمونیفیکاسیون (توسط باکتری‌های غیرتثبیت‌کننده نیتروژن) با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج نشان داد از میان ۳۵ سویه جداسازی شده، فقط ۷ سویه *بِنی‌باسیلوس* قادر به تولید آمونیاک طی فرآیند تثبیت نیتروژن بودند. مقایسه تولید آمونیاک در فرآیند آمونیفیکاسیون و فرآیند تثبیت نیتروژن توسط این باکتری نشان داد که تولید آمونیاک به مقدار بیش‌تر و برای مدت طولانی‌تری توسط آن انجام می‌شود.

روش اختلاف که در واقع مبتنی بر میزان نیتروژن موجود در بافت گیاهان تلقیح شده با باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن و بافت گیاهی تیمار شاهد (بدون تلقیح) می‌باشد، حتی با وجود دقت کمتر، به علت دسترسی بیش‌تر و قابلیت انجام در اغلب آزمایشگاه‌ها که با بهره‌گیری از روش کجلدال صورت می‌پذیرد، مورد استفاده است. در این شیوه کارایی تثبیت نیتروژن که در واقع نشان‌دهنده تفاوت میزان نیتروژن در تیمار باکتری نسبت به تیمارهای کودی و شاهد می‌باشد قابل اندازه‌گیری است و طبق دستورالعمل جدید کنترل کیفی کودهای زیستی یکی از ملاک‌های تأیید باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن به عنوان کود زیستی نیتروژنی، دارا بودن کارایی تثبیت بیش از ۷۰٪ می‌باشد (خاوازی ۱۳۸۶). همین روش با بهره‌گیری از تعیین مقدار نیتروژن در بیوماس میکروبی بعد از کشت در محیط‌های عاری از نیتروژن بدون حضور گیاه نیز قابل انجام است، به صورتی‌که کانیموژی و پانیرسلوام (۲۰۱۰) به روش میکروکجلدال توانایی تثبیت برخی جدایه‌های تثبیت‌کننده نیتروژن را مشخص ساختند. مسکاروا–اسپارزا و همکاران (۱۹۹۸) فعالیت نیتروژنازی جدایه‌های *آزوسپیریلوم* را در دامنه ۱۷/۶ تا ۴۹/۶ (nmol C_2H_4 $ml^{-1}h^{-1}$) گزارش کردند. هاتلا و همکاران (۱۹۸۳) بیش‌ترین میزان فعالیت نیتروژنازی را در *اشریشیا آگلومرانز* ۱۰٪ و در *کلبسیلا پنومونیا* و *آزوسپیریلوم لیپوفروم* ۵۰٪ در محیط کشت نیمه جامد فاقد نیتروژن همراه با مالات یا ساکارز گزارش کردند.

به علت اهمیت تغذیه نیتروژن در گیاهان و هم‌چنین به جهت جدی بودن خطرات مصرف کودهای شیمیایی

[2] Acetylene reduction assay
[3] Difference method

برای محیط زیست، استفاده از روش‌های بیولوژیک برای تأمین نیاز غذایی گیاهان و در عین حال حفظ عملکرد قابل قبول از علل لزوم انجام مطالعات در زمینه توان ریزجانداران برای تأمین نیازهای گیاهی به‌خصوص نیتروژن می‌باشد. از طرفی به علت عدم مشخص بودن توان تثبیت نیتروژن باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق، این آزمایش با هدف بررسی میزان تثبیت نیتروژن تعدادی از باکتری‌ها به روش کجلدال جهت بررسی اولیه آن‌ها برای معرفی به آزمایش‌های بعدی انجام گرفت. بدین منظور از دو محیط جامد و مایع LG جهت کشت باکتری‌ها و تعیین میزان نیتروژن تثبیت شده استفاده شد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد استفاده

در این آزمایش۲۲ جدایه باکتریایی مختلف حاصل از محیط کشت‌های اختصاصی *ازتوباکتر* مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در این آزمایش از نظر جنس و گونه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مشخصات جنس و گونه جدایه‌های باکتری مورد استفاده در آزمایش که شناسایی آن‌ها به روش مولکولی انجام گرفته است.

نام باکتری	جدایه‌های باکتریائی	نام باکتری	جدایه‌های باکتریائی
Azotobacter chroococcum	14SP-I	*Beijerinckia* sp.	2SP-5
Azotobacter chroococcum	14SP2-1	*Klebsiella oxytoca*	3A-1
Pseudomonas sp.	35SP-2	*Klebsiella oxytoca*	4A-1
Pseudomonas sp.	14A-4	*Rhizobium* sp.	12A-3
Azotobacter chroococcum	16SP-2	*Pseudomonas* sp.	16SP7-2
Pseudomonas sp.	S19-1	*Agrobacterium* sp.	22SP-1
Citrobacter sp.	44A-4s	*Pseudomonas* sp.	24A-1
Azotobacter chroococcum	44SP-2	*Pseudomonas* sp.	34SP-III
Klebsiella sp.	47A1-3	*Alcaligenese* sp.	35A
Achromobacter sp.	14SP-III	*Sphingomonas* sp.	37SP
Microbacterium sp.	44A-4z	*Beijerinckia* sp.	43SP-2

باکتری‌ها از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تأمین شدند. جدایه‌های مورد استفاده از سه استان آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان از خاکهای ریزوسفری و غیرریزسفری تحت کشت گیاهان گندم، جو، برنج، ذرت، پوشش مرتعی و گیاهان لگوم از قبیل یونجه، لوبیا و عدس جداسازی شده‌اند (ابراهیمی و همکاران، اطلاعات منتشر نشده). گفتنی است که جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های فوق از روش تهیه خمیره خاک در پلیت (soil paste–plate)، یا تهیه سری رقت و کشت در محیط حداقل فاقد نیتروژن (نظیر LG، Jensen و Winogradsky) انجام گرفته است (آکیلانتی و همکاران ۲۰۰۴). جداسازی و تهیه کلکسیون اولیه این باکتری‌ها بیشتر بر اساس فنوتیپ مورد انتظار از باکتری‌های *ازتوباکتر* صورت گرفته و توجه به خصوصیات ظاهری کلنی از قبیل کلنی‌های نرم، پهن، شفاف یا شیری و موکوئیدی یا تولید رنگیزه، تولید پلی‌ساکارید و تولید کیست ملاک انتخاب بوده است (موتسارا و روی ۲۰۰۸).

اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن

برای اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن باکتری‌ها در محیط کشت جامد و مایع، ابتدا کشت شبانه جدایه‌ها در محیط **NB** مایع انجام گرفت. سپس در محیط **LG** مایع و **LG** جامد (جدول ۲) کشت شد (صفری سنجانی و همکاران ۱۳۸۹). در محیط جامد **LG**، کشت **Lawn** یا چمنی انجام شد تا رشد میکروبی در کل سطح پلیت ۸ سانتی‌متری ظاهر شود. بعد از گذشت ۷ روز از کشت جدایه‌ها در محیط جامد و مایع **LG**، از محیط کشت حاوی رشد میکروبی برای ادامه آزمایش و عمل هضم استفاده شد. برای انجام آزمایش در محیط کشت مایع ابتدا محیط‌ها در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و میزان تثبیت نیتروژن در دو بخش روشناور و ته‌نشست به طور مجزا مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. لازم به ذکر است که محیط جامد و مایع **LG** بدون انجام کشت میکروبی به عنوان کنترل منفی یا شاهد نیز در آزمایش در نظر گرفته شد.

برای اندازه‌گیری نیتروژن در کشت‌های جامد و هم‌چنین بخش ته‌نشین شده کشت‌های مایع از روش کجلدال و برای بخش روشناور محیط کشت مایع از روش فنل-سود (رامپ و کریست ۱۹۸۸، علی‌اصغرزاد ۱۳۸۹) استفاده شد.

جدول۲- اجزای محیط کشت LG.

اجزای محیط کشت	مقدار مورد نیاز ($g\ L^{-1}$)
ساکارز	۲۰
K_2HPO_4	۰/۰۵
KH_2PO_4	۰/۱۵
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲
$CaCO_3$	۱
$CaCl_2$	۰/۰۱
$FeCl_2$	۰/۰۱
$Na_2MoO_4.4H_2O$	۰/۰۰۲
آگار	۱۵

روش کجلدال برای اندازه‌گیری میزان نیتروژن

در مورد کشت جامد میکروبی، یک چهارم پلیت با رشد میکروبی تقریباً یکنواخت و در مورد محیط کشت مایع ته‌نشست باکتری پس از توزین نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری‌ها بر اساس وزن مرطوب نمونه‌ها انجام گرفت. سپس نمونه‌ها به روش تر سوزانی هضم شدند. در مرحله پایانی هضم، عصاره‌ها به رنگ سبز روشن بودند. پس از خنک شدن، عصاره‌ها تقطیر شده و سپس با اسیدسولفوریک تیتر شدند (والینگ و همکاران ۱۹۸۹، راول ۱۹۹۴).

روش فنل- سود برای اندازه‌گیری نیتروژن کل

با توجه به اینکه میزان نیتروژن موجود در روشناور کشت مایع باکتری‌ها بسیار اندک بوده و به روش کجلدال قابل اندازه‌گیری نبود، از روش فنل-سود برای تعیین آن بهره برده شد. به این صورت که به ۳۰ میلی‌لیتر محلول روشناور، ۰/۵ گرم کاتالیزور (مخلوط سولفات‌ها)، ۳ میلی‌لیتر اتانول و سپس ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه شد و بقیه مراحل هضم تا افزایش دما به ۳۸۰ درجه سلسیوس و ظهور رنگ سبز روشن روی بلوک هضم ادامه یافت. پس از سرد شدن حجم نهایی عصاره‌ها با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد (رامپ و کریست ۱۹۸۸). سپس از روش فنل- سود برای اندازه گیری نیتروژن استفاده شد که برای این کار در ابتدا محلول استاندارد ($mg\ L^{-1}$) ۱۰۰۰ آمونیوم، با حل کردن ۳/۸۲۱ گرم کلرید آمونیوم در یک لیتر آب مقطر تهیه شد و سپس با استفاده از این محلول

اولیه، محلول استاندارد ثانویه ($10mg\ L^{-1}$) و سپس محلول‌های استاندارد کاری صفر تا ۵ ($mg\ L^{-1}$) تهیه شد. برای انجام این روش محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ و محلول فنل- سود طبق روش زیر تهیه شد:

برای تهیه محلول فنل، ۶۲/۵ گرم فنل را در مقدار کمی اتانول حل کرده سپس ۲۰ میلی‌لیتر استن اضافه نموده و با اتانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول سود نیز از انحلال ۲۷ گرم NaOH در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به دست آمد. سپس محلول فنل – سود از آمیختن ۲۰ میلی‌لیتر محلول فنل و ۲۰ میلی‌لیتر محلول سود و ۶۰ میلی‌لیتر آب تهیه شد. ۲۵ میلی‌لیتر عصاره به‌دست آمده از هضم بخش روشناور (حاصل از رسوب باکتری در محیط LG مایع) به داخل بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال یافت و به آن ۲ میلی‌لیتر محلول فنل- سود و بلافاصله ۳ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ اضافه شد، مخلوط حاصل به مدت ۹۰ دقیقه به حال خود گذاشته شد تا تشکیل رنگ آبی تکمیل گردد. سپس مقدار جذب محلول‌های رنگی در طول موج ۶۳۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. با رسم نمودار کالیبراسیون برای محلول‌های استاندارد، غلظت نمونه‌ها به دست آمد. روش فوق با تغییراتی از روش اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز (علی‌اصغرزاد ۱۳۸۹، بی‌نام ۲۰۰۰) انجام شد.

طرح آماری

این آزمایش با در نظر گرفتن ۲۳ تیمار آزمایشی (۲۲ تیمار باکتریایی و یک تیمار شاهد بدون تلقیح میکروبی) انجام شد. طرح آزمایشی مورد استفاده، طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن ۳ تکرار بود. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج

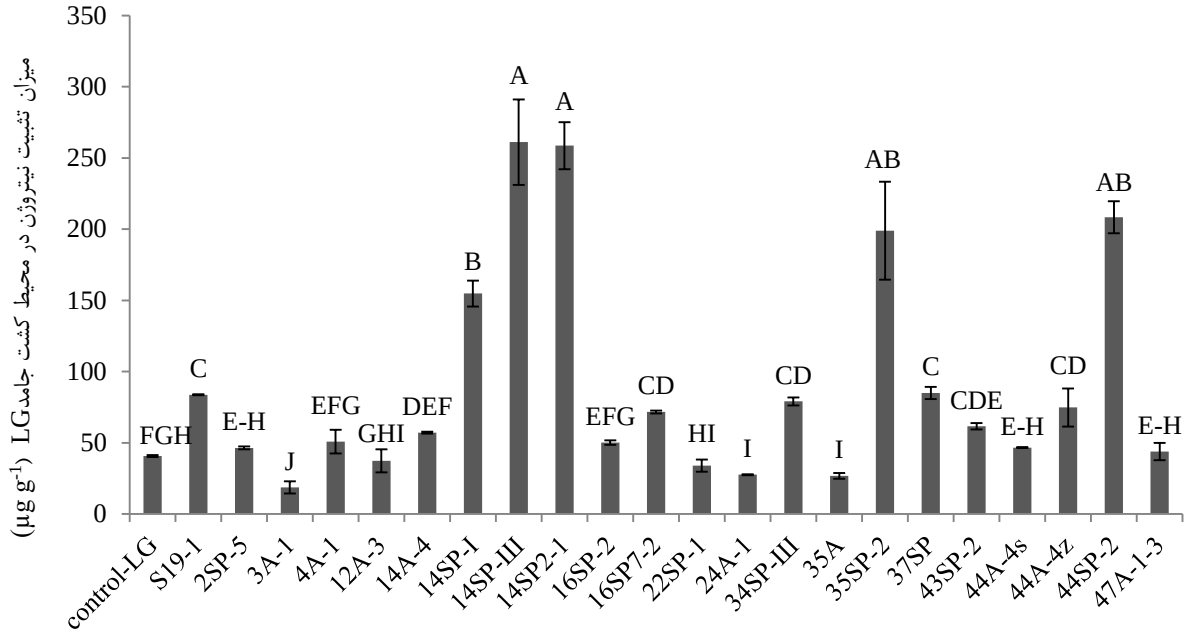
میزان تثبیت نیتروژن در محیط کشت جامد

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، میزان تثبیت نیتروژن باکتری‌ها در محیط کشت جامد فاقد نیتروژن در سطح احتمال ۱٪، تحت تأثیر جدایه‌های باکتریایی قرار گرفت. نتایج مقایسه‌های میانگین نشان داد بیش‌ترین میزان تثبیت نیتروژن در طول ۷ روز، در جدایه‌های 14SP-III و 14SP2-1 به ترتیب برابر با ۲۶۱/۱۰ و ۲۵۸/۶۴ ($\mu g\ g^{-1}$) بوده که باهم در یک گروه آماری هستند اما با اختلاف ۶/۳ برابری نسبت به شاهد، دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند. جدایه‌های 44SP-2، 35SP-2 و 14SP-I نیز در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند که باهم در یک گروه آماری هستند. کمترین میانگین تثبیت ۱۸/۷۷ ($\mu g\ g^{-1}$) در جدایه 3A-1 مشاهده شد که با کاهش ۵۳/۹۷٪ نسبت به شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌دار با آن است (شکل ۱).

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان تثبیت نیتروژن جدایه‌های باکتری در محیط کشت مایع و جامد **LG**.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تثبیت نیتروژن در محیط کشت مایع	تثبیت نیتروژن در محیط کشت جامد
تیمار	۲۲	۰/۲۸۶**	۰/۳۱۰**
خطای آزمایشی	۴۶	۰/۰۰۹	۰/۰۷۷
ضریب تغییرات (٪)		۳/۴۸	۴/۴۶

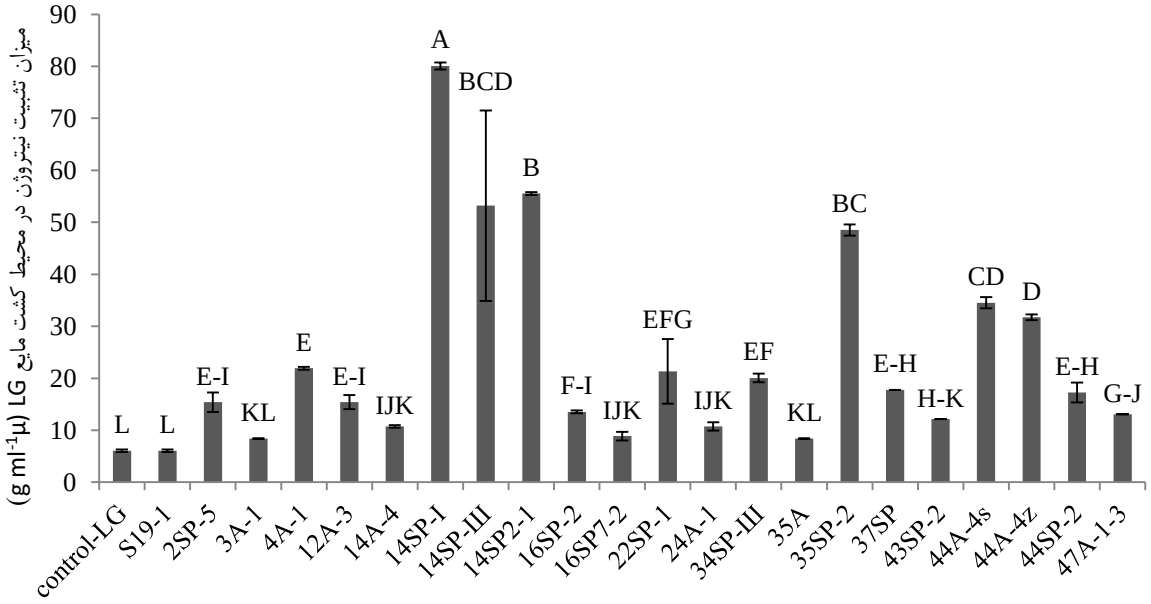
** **معنی‌دار در سطح ۱٪**



شکل ۱- میزان تثبیت نیتروژن جدایه‌های باکتری در محیط کشت جامد **LG**.

میزان تثبیت نیتروژن در محیط کشت مایع

در بخش ته‌نشین شده محیط کشت مایع LG، که به روش کجلدال مورد آزمایش قرار گرفت، نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که جدایه‌های باکتری در سطح احتمال ۱٪ از نظر تثبیت نیتروژن با هم تفاوت آماری دارند. در بخش ته‌نشست برای بیان مقدار نیتروژن از واحد $\mu g\ ml^{-1}$ استفاده شد. بیش‌ترین میزان تثبیت در جدایه 14SP-I و برابر با ۸۰ ($\mu g\ ml^{-1}$) بوده که با افزایش ۱۳/۲ برابری، اختلاف آماری معنی‌دار با شاهد داشت. پس از آن جدایه‌های 14SP2-1، 35SP-2 و 14SP-III مقادیر بالایی از تثبیت نیتروژن را به خود اختصاص داده‌اند که با شاهد اختلاف آماری معنی‌دار داشتند. کمترین میزان تثبیت نیتروژن در شاهد و جدایه S19-1 دیده شد که برابر با ۸/۴ ($\mu g\ ml^{-1}$) می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- میزان تثبیت نیتروژن جدایه‌های باکتری در محیط کشت مایع LG.

اما بررسی میزان تثبیت نیتروژن در روشناور محیط کشت مایع که به روش فنل- سود انجام شد، نشان داد در بخش روشناور میزان نیتروژن موجود قابل اندازه‌گیری نیست. به گونه‌ای که نمونه‌های مورد آزمایش هیچ گونه تغییر رنگی نداشته و در طی رنگ‌سنجی مقدار صفر قرائت گردید. در روش فنل- سود که روش حساسی به مقادیر کم آمونیم است، در حضور نیتروژن آمونیمی شاهد تشکیل رنگ آبی خواهیم بود.

بحث

بالا بودن میزان نیتروژن اندازه‌گیری شده در روش فوق نشان از کارایی بالاتر تثبیت نیتروژن جدایه‌های منتخب می‌باشد. پس از بررسی این جدایه‌ها مشخص شد بیش‌تر جدایه‌هایی که در کشت‌های درون‌شیشه‌ای نتایج بهتری داشته‌اند، *ازتوباکتر کروکوکوم* بوده‌اند که شامل **14SP-I**، **14SP2-1**، **44SP-2** هستند اما جدایه‌های **14SP-III** و **35SP-2** با وجود اینکه به ترتیب متعلق به جنس *آکروموباکتر* و *سودوموناس* هستند، توان تثبیت نیتروژن بالایی از خود نشان دادند. دی‌آزوتروف‌ها شامل طیف وسیعی از باکتری‌ها هستند که فقط مهم‌ترین و فراوان‌ترین باکتری‌های این گروه *ازتوباکتر*، *سودوموناس* و *آزوسپیریلوم* می‌باشد. باکتری‌های *آزوارکوس*، *استوباکتر*، *انتروباکتر*، *بیجرینکیا*، *هرباسپریلوم* و *پنی‌باسیلوس* و غیره جز دی‌آزوتروف-ها می‌باشند (خسروی ۱۳۹۲، پائول ۲۰۰۷) و نتایج آزمایش گویای این مسأله می‌باشد. اما تفاوت در نتایج به دست آمده از محیط کشت‌های مایع و جامد که نشان از بالا بودن میزان تثبیت نیتروژن در محیط کشت جامد دارد، می‌تواند مربوط به رشد بیش‌تر باکتری‌ها و تولید بیوماس میکروبی بالاتر باشد که این خود به دلیل سازگاری بیش‌تر باکتری‌های مورد آزمایش با محیط کشت جامد است که توانسته میزان بیش‌تری نیتروژن در بیوماس خود تثبیت نماید. دلیل دیگر تفاوت را باید در واحدهای انتخاب شده برای بیان مقدار نیتروژن تثبیت شده جستجو نمود ($\mu g\ g^{-1}$ در مقابل $\mu g\ ml^{-1}$). به نظر می‌رسد برای اینکه نتایج این دو محیط کشت را قابل مقایسه‌تر با هم دانست، حجم محیط کشت به کار رفته در کشت جامد و مایع برای یک باکتری مشخص بایستی کاملاً یکسان و یک‌اندازه باشد هرچند با توجه به نتایج همبستگی، بین میزان تثبیت نیتروژن در دو محیط کشت مایع و جامد همبستگی مثبت و معنی‌داری

(**r= ۰/۶۹) وجود داشت. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین نتایج حاصل از محیط کشت جامد و مایع حاکی از این موضوع می‌باشد که رشد باکتری‌ها و میزان تثبیت آن‌ها در دو محیط، همسو بوده اما در دو محیط کشت مایع و جامد متفاوت است.

روش‌های تعیین میزان تثبیت نیتروژن متفاوت بوده که بر اساس شرایط و امکانات موجود انتخاب می‌گردد. به عنوان مثال روش سنتی برای برآورد تثبیت زیستی نیتروژن، روش افزایش رشد در محیط کشت فاقد نیتروژن می‌باشد که یک روش چشمی بوده و در گذشته منجر به تحقیقات روی عوامل شناخته شده یا مدعی تثبیت نیتروژن شده است. روش اختلاف مقدار نیتروژن یک روش کمی بوده ولی افزایش کمتر از ۱٪ در نیتروژن کل را با وجود نمونه‌های یکنواخت نمی‌تواند برآورد کند (باریس و ویلسون ۱۹۷۹) روش ایزوتوپ نشان‌دار یک روش کمی و بسیار دقیق از مقدار تثبیت نیتروژن بوده و مقدار قطعی از تثبیت را در اختیار قرار می‌دهد (سیلویا و همکاران ۱۹۹۹). روش احیای استیلن به اتیلن نیز از جمله روش‌های بسیار سریع، دقیق و راحت می‌باشد اما نیازمند دستگاه کروماتوگرافی گازی است که شاید در هر آزمایشگاهی در دسترس نباشد. به نمونه‌هایی از مطالعات در این زمینه با روش‌های مختلف اشاره می‌شود. در مطالعه‌ای کانیموژی و پانیرسلوام (۲۰۱۰) توانایی تثبیت نیتروژن *آزوسپیریلوم* را به وسیله روش میکروکجلدال در محیط کشت نیمه‌جامد فاقد نیتروژن همراه مالات مورد سنجش قرار دادند. از بین ۳۰ ایزوله مورد آزمایش، فقط ۲۸ جدایه قادر به تثبیت نیتروژن بودند که دامنه توانایی تثبیت نیتروژن آن‌ها از ۳/۳ تا ۱۵/۶ ($mgN\ g^{-1}$) متغیر بود و در بین آن‌ها فقط ۱۰ ایزوله قادر به تولید بیش‌ترین مقدار نیتروژن بودند. باکتری‌های *آزوسپیریلوم* باکتری‌های همیار می‌باشند و توان تثبیت نیتروژن بالاتری از ازتوباکترهای آزادزی دارند. از طرفی روش میکروکجلدال دقیق‌تر از کجلدال بوده و با حساسیت بیش‌تری نتیجه را به دست می‌دهد. لذا مهم‌ترین دلیل اختلاف مقادیر حاصل از آزمایش فوق و آزمایش مدنظر همین تفاوت جنس باکتری‌ها می‌باشد.

رجایی و همکاران (۱۳۸۶) توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی را در ۶۳ جدایه *ازتوباکتر* مورد بررسی قرار دادند، نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که ۳۴ جدایه این توانایی را داشتند و بالاترین میزان آن را ۸/۳ ($nmol\ C_2H_4\ h^{-1}$) گزارش نمودند. تجرا و همکاران (۲۰۰۵) مقدار تثبیت نیتروژن توسط *ازتوباکتر کروکوکوم* را بین ۷۹/۶ تا ۳۲۹/۵ ($nmol\ C_2H_4\ h^{-1}$) گزارش نمودند. بهروز و همکاران (۱۳۹۵) ۴۳ جدایه *ازتوباکتر* را از خاک‌های سطح استان گلستان جداسازی کردند. برای انجام آزمایش باکتری‌ها در محیط کشت مایع فاقد نیتروژن وینوگرادسکی کشت داده شد. سپس به منظور بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکولی از روش احیای استیلن و دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده شد. در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز با استفاده از روش اخیر، انتظار می‌رفت که تمامی جدایه‌ها باعث احیای استیلن شوند، اما تعدادی از جدایه‌ها پتانسیل تثبیت را از خود بروز ندادند. این در حالی است که تمام جدایه‌های *ازتوباکتر* در یک محیط فاقد منبع نیتروژن نیتراتی و آمونیومی قادر به رشد بودند. به نظر میرسد مقادیر اندک تثبیت توسط باکتریها با این شیوه قابل سنجش نبوده است یا وجود ناخالصی‌های ناخواسته نیتروژنی در محیط کشت، عامل رشد باکتریها در محیط کشت و تامین نیتروژن برای رشد باکتریها بوده است. نتیجه آزمایش نشان داد بیش‌ترین میزان تثبیت نیتروژن ۲۷۶ ($nmol\ C_2H_4\ h^{-1}$) بوده است. بیابانی (۱۳۸۷) باکتری‌های ***Bacillus polymixa* 42** و مخلوط دو باکتری (***Arthrobacter* sp + *Xanthomonas* sp.**) را از بین ۴۲ باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن به عنوان کاراترین باکتری‌های تثبیت‌کننده در آزمایش معرفی و توان تثبیت نیتروژن آن‌ها را به ترتیب ۰/۶ و ۱/۲ ($nmol\ C_2H_4\ 10^{-6}cell\ h^{-1}$) گزارش کردند. کیزیلکایا (۲۰۰۹) با بررسی ظرفیت تثبیت نیتروژن *ازتوباکتر* در محیط کشت (از خاک‌های شمال آناتولی ترکیه) گزارش داد که مقدار تثبیت نیتروژن بین ۳/۵ تا ۲۹/۴۵ و میانگین ۱۰/۲۴ ($mg\ L^{-1}$) در محیط کشت بوده است. مقایسه آزمایش کیزیلکایا و نتایج حاصل از باکتری‌های مورد استفاده در آزمایش حاضر که در محیط کشت مایع مورد

بررسی قرار گرفتند، نشان می‌دهد میزان تثبیت نیتروژن بین کل باکتری‌های مورد آزمایش در محدوده ۸/۴ و ۸۰ ($mg\ L^{-1}$) بوده و بیش‌ترین میزان تثبیت در *ازتوباکتر* کروکوکوم بوده است. اما میانگین تثبیت نیتروژن بین جدایه‌های *ازتوباکتر* در محیط کشت مایع ۴۱/۵۸ ($mg\ L^{-1}$) و در محیط کشت جامد ۱۶۷/۹۹($\mu g\ g^{-1}$) حاصل شد. تفاوت در نتایج آزمایشات و مقادیر نیتروژن تثبیت شده را می‌توان به گونه باکتریها، نوع محیط سنجش، مدت زمان سنجش و بعضاً روش‌های مورد استفاده در تعیین کارایی باکتریها نسبت داد.

نتیجه‌گیری کلی

هدف از این آزمایش تعیین برتری نسبی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در شرایط درون‌شیشه‌ای بود، تا ضمن غربال و انتخاب جدایه‌های با توان تثبیت نیتروژن بالا، جدایه‌های کارآمدتر در انجام آزمایش‌های گلدانی و مزرعه‌ای استفاده شوند. هر چند روش کجلدال دقت بالایی ندارد اما روش ساده و کم هزینه بوده و برای انتخاب باکتری‌هایی که توان تثبیت نیتروژن خیلی بالاتری از بقیه جدایه‌ها دارند، می‌تواند کارآمد باشد. نتیجه به دست آمده از آزمایش‌های درون‌شیشه‌ای نشان داد جدایه‌های **14SP-I**، **14SP-III**، **14SP2-1**، **35SP-2** و **44SP-2** شرایط بهتری از نظر توان تثبیت نیتروژن دارند و در صورت تأیید باکتری‌ها از نظر ایمنی و عدم بیماری‌زایی آن‌ها، برای انجام آزمایش‌های گلدانی یا مزرعه‌ای پیشنهاد می‌شوند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی دانشگاه تبریز و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در اجرای این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

Aliasgharzad N, 2006. Methods in soil biology (translated). Tabriz university press. Tabriz. (In Persian)

Anonymous, 2000. How to measure Ammonia Nitrogen: Phenate Method HOP Technical Assistance Hydrology project, World Bank and Government of the Netherlands funded. New Delhi.

Anonymous, 2005. Fertilizer Use by Crop in the Islamic Republic of Iran. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Italy.

Anonymous, 2006. Biofertilizer Manual, FNCA Biofertilizer Project Group. Atomic Industrial Forum. Japan.

Aquilanti L, Favilli F and Clementi F, 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. Soil Biology and Biochemistry 36: 1475–1483.

Behrooz A, Olamaee M, Movahedi Naeeni SAR and Gorbani Nasrabadi T, 2016. Evaluation of plant growth promotion characteristics of native soil *Azotobacter* isolates from golestan province. Soil Management and Sustainable Production 6(1): 233-246. (In Persian with English abstract)

Biabani A, 2008. Formation of artificial nitrogen-fixing bacteria symbiosis with wheat. Journal of Applied Biosciences 6(2): 169-172.

Burris RH and Wilson PW. 1972. Methods for measurement of nitrogen fixation. Pp. 355-367. In: Colowick SP and Kaplan NO, (eds.) Methods in Enzymology, vol. 4. Academic. New York.

Dalton DA and Kramer S, 2006. Plant Associated Bacteria. Springer, The Netherlands.

Dixon ROD and Wheeler CT, 1986. Nitrogen Fixation in Plants. Chapman and Hall, New York.

Dobereiner J and Baldani VLD, 1998. Biological Nitrogen Fixation by Endophytic Diazotrophs in Non-Legumes Crops in the Topics. Academic Publishers, Dordocht, The Netherlands.

Dobereiner J, 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics, social and economic contributions. Soil Biology and Biochemistry 29: 771-774.

Ebrahimi M, Safari Sinegani AA, Sarikhani MR, Mohammadi SA, Aliasgharzad N, 2018. Isolation, identification, and determination of plant growth promoting properties of Azotobacteria isolated from soil samples north-west of Iran under different land use. Applied Soil Researches 6 (2): 28-42.

Haahtela K, Kari K and Sundman V, 1983. Nitrogenase activity (acetylene reduction) of root-associated, cold-climate *Azospirillum*, *Enteribacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* species during growth on various

carbon sources and at various partial pressures of oxygen. Applied and Environmental Microbiology 45(2): 563-570.

Kanimozhi K and Panneerselvam A, 2010. Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum spp*. isolated from Thanjavur district. Der Chemica Sinica 1(3): 138-145.

Khavazi K, 2009. Protocols in Biofertilizers Assessment. Soil and Water Research Institute. Pp 17-19.

Khosravi H, 2013. Biofertilizers containing plant growth promoting rhizobacteria: strength and weeknesses. Journal of Land Management 1(1): 33-46. (In persain)

Kizilkaya R, 2009. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. Journal of Environmental Biology 31(1): 73- 82.

Mascarua– Esparza MA, Villa-Gonjzalez R and Caballero J, 1998. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cactaceous plants. Plant and Soil 106: 91-95.

Motsara MR and Roy RN, 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The University of Michigan, USA.

Narula N, and Kupta KG, 1986. Ammonium excretion by *Azotobacter chroococcum* in liquid culture and soil in the presence of manganese and clay minerals. Plant and Soil 93: 205-209.

Palleroni NJ, 1984. Gram negative aerobic rods and cocci. Pp. 140-199. In: Krieg, NR, (Ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, Williams and Wilkins, Baltimore.

Paul EA, 2007. Soil Microbiology and Biochemistry. Third edition. Linacre House, Jordan Hill, Oxford OX2 8DP, UK.

Rajaee S, Alikhani A and Raiesi F, 2007. Effect of plant growth promoting potentials of *Azotobacter chroococcum* native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat. Journal of Water and Soil Science 11(41): 285-296. (In persain)

Rowell DL, 1994. Soil Science: Method and Application. Longman Scientific and Technical, Soil and Plant Analysis, Wageningen Agriculture University, The Netherland. 350 p.

Rump HH and Krist H, 1988. Laboratory Manual of the Examination of Water and Soil. VCH publishers. Escbborn, Germany.

Saribay GF, 2003. Growth and Nitrogen Fixation Dynamics of *Azotobacter chroococum* in Nitrogen-Free and OMW Containing Medium. Middle East Technical University, Ankara.

Sarikhani MR and Moradi S, 2015. Review on the researches of biofertilizers in Iran. The eighth national conference on agriculture research findings. University of Kurdistan, Sanandaj. Iran. (In Persian)

Shokri D, Emtiazi G and Abassi S, 2012. Investigation of free ammonium production by bacteria in nitrogen fixation process. Agronomy journal 93: 93-103. (In Persian with English abstract)

Sylvia DM, Fuhrman JJ, Hartel PG, Zuberer DA. 1999. Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, New Jersey.

Tejera N, Lluch C, Martinez-Toledo MV and Gonzalez-Lopez J, 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. Plant and Soil 270: 223–232.

Waling I, Vark WV, Houba VJG and Van der lee JJ, 1989. Soil and Plant Analysis, a series of syllabi. Part 7. Plant Analysis Procedures. Wageningen Agriculture University, The Netherland.