بررسی توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن در جدایه‌های مختلف باکتری *Azospirillum* جداسازی شده از ریزوسفر کلزا در نقاط مختلف استان گلستان

نگار قادری[1*]، محسن علمائی[2]، محمد حسین ارزانش[3]، رضا قربانی نصرآبادی[4]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیولوژی خاک، گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

2- استادیار پژوهشی، گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

3- استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

4- دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم خاک، دانشگاه تهران

ghaderi.n61@gmail.com *

چکیده

کاهش مواد آلی و آلودگی‌های زیست محیطی باعث گردیده تا در سال‌های اخیر توجه به کودهای بیولوژیک بیشتر شود. یکی از شاخص‌های مهم استفاده از باکتری‌های موجود در مایه تلقیح‌ها یا کودهای بیولوژیک، توانایی تثبیت نیتروژن ملکولی است. باکتری آزوسپیریلوم توانایی تثبیت نیتروژن به شکل همیاری را دارد، اما بین جدایه‌های مختلف آن از لحاظ میزان تثبیت تفاوت وجود دارد. هدف از اجرای این تحقیق بررسی توان تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در 14 جدایه بومی *Azospirillum* جداسازی شده از ریزوسفر کلزا در استان گلستان بود. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که بین جدایه‌ها، تفاوت معنی‌داری درسطح یک درصد وجود داشت و جدایه‌های VII-49، II-51 و VI-51 به ترتیب با مقادیر 60/64، 57/707 و 56/706 نانومول اتیلن در ساعت در میلی‌لیتر دارای بیشترین میزان نیتروژن تثبیت شده بودند.

کلمات کلیدی: *Azospirillum* spp.، تثبیت بیولوژیک نیتروژن، کلزا

مقدمه

دانه‌های روغنی بعد از غلات به‌عنوان دومین منبع تولید انرژی در تغذیه انسان مطرح می‌باشند و از طرفی کنجاله حاصل از فرآیند صنعتی آنها نیز به لحاظ سرشار بودن از پروتئین یکی از اقلام مهم تغذیه دام، طیور و آبزیان به‌شمار می‌رود (شهیدی و فروزان، 1376). کلزا گیاهی است که در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای را در کشور و مخصوصاً در استان گلستان به خود معطوف داشته است. به طوری‌که حدود 33000 هکتار از اراضی استان گلستان به کشت این گیاه جهت استحصال روغن اختصاص یافته است (بی‌نام، 1387). نیاز بالای این گیاه به نیتروژن و نداشتن ارتباط میکوریزی این خانواده با قارچ‌های میکوریز باعث گردیده تا در سال‌های اخیر امکان استفاده از باکتری‌های PGPR به عنوان مکمل کودهای شیمیایی مجدداً مورد بررسی قرار گیرد. با سابقه‌ترین و در حال حاضر رایج‌ترین انواع کودهای زیستی، مربوط به تثبیت کننده‌های نیتروژن است که در سطح جهانی مجموع مقدار نیتروژنی که از این طریق به خاک اضافه می‌شود، حدود 175 میلیون تن در سال برآورد شده است (خاوازی و ملکوتی، 1380). باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR[1]) از جمله باکتری‌های ریزوسفری هستند که می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی در افزایش راندمان کود و آب و در نهایت روی عملکرد محصولات زراعی اثرات مثبتی داشته باشند. این دسته از موجودات خاکزی می‌توانند در تأمین برخی از عناصر (بالاخص نیتروژن و در آزادسازی عناصر دیگر مثل فسفر و آهن از اشکال کم محلول یا نامحلول) نقش مهمی داشته باشند (دوبرینر و دی، 1976). باکتری جنس *Azospirillum* نیز از باکتری‌های PGPR می‌باشد که در ریزوسفر و فضای بین سلولی ریشه غلات و سایر گیاهان مشاهده شده است. از ویژگی‌های مفید این باکتری

[1]. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

می‌توان به تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، افزایش حلالیت فسفات‌های نامحلول، تولید سیدروفور، بهبود جذب آب و عناصر غذایی و نهایتاً افزایش عملکرد گیاهان اشاره کرد (اوکان و لاباندرا-گونزالز، 1994؛ دوبرینر و دی، 1976). تثبیت بیولوژیک نیتروژن (BNF[1]) توسط باکتری‌های دی‌آزوتروف صورت می‌گیرد که دارای آنزیم نیتروژناز[2] هستند (ماسپول و کلیپ، 1996؛ کیم و رس، 1994). این باکتری‌ها توسط سیستم آنزیمی خود، باند سه‌گانه بین ملکول‌های نیتروژن اتمسفری را شکسته و آن را به آمونیاک تبدیل می‌کنند (پوتکر، 2000). دو روش ایزوتوپ پایدار نیتروژن (^{15}N) و احیای استیلن (ARA[3]) جهت اندازه‌گیری فعالیت نیتروژنازی باکتری‌ها استفاده می‌شود که روش ایزوتوپ پایدار به‌دلیل احتیاج به دقت بالا و نیز پرهزینه بودن، کمتر به‌کار می‌رود. اما روش احیای استیلن به‌طور گسترده کاربرد دارد (محمدی، 1388).

مواد و روشها

در این تحقیق 38 نمونه خاک و ریشه گیاه کلزا از مناطق مختلف استان گلستان جهت جداسازی باکتری *Azospirillum* استفاده شد. ابتدا آزمایشات اولیه شناسایی جنس و سپس آزمایشات تکمیلی شناسایی گونه بر روی جدایه‌های *Azospirillum* شده انجام گردید و در نهایت میزان فعالیت نیتروژنازی در 14 جدایه برتر بومی *Azospirillum* به روش احیای استیلن توسط دستگاه GC[4] مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور لوله‌های آزمایش کوچک به حجم 13 میلی‌لیتر انتخاب و به میزان 5 میلی‌لیتر محیط NFb[5] به‌علاوه نیم گرم در لیتر آگار به هر لوله منتقل گردید. پس از استریل شدن در اتوکلاو (به‌مدت20 دقیقه در دمای 120 درجهٔ سانتی‌گراد)، محیط‌های NFb نیمه‌جامد توسط کلنی‌های خالص *Azospirillum* تلقیح و در دمای 32 درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از 72 ساعت درپوش‌های پنبه‌ای لوله‌ها با درپوش‌های لاستیکی استریل تعویض شدند. سپس 10 درصد حجم باقی‌مانده از لوله (0/7 میلی‌لیتر با احتساب حجم لاستیک) توسط سرنگ، خالی و به همان میزان گاز استیلن تزریق گردید. درزهای درپوش‌های لاستیکی با پارافیلم پوشانده شد و مجدداً لوله‌ها به انکوباتور انتقال یافتند. پس از گذشت 24 ساعت مقدار 0/7 میلی‌لیتر از هوای داخل هر لوله توسط سرنگ هامیلتون کشیده شد و به دستگاه GC تزریق گردید. غلظت اتیلن تولید شده توسط هر جدایه با مقایسه سطح زیر پیک ایجاد شده توسط استاندارد تهیه شده از گاز اتیلن خالص با غلظت‌های 0/2، 0/4، 0/6، 0/8 و 1 میکروگرم محاسبه گردید (تارنر وگیبسون، 1980). آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی بر روی جدایه‌های *Azospirillum* در 3 تکرار و به روش آزمون LSD در سطح 5 درصد انجام شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق از 38 نمونه خاک و ریشه گیاه کلزا از مناطق مختلف استان گلستان، 58 جدایه *Azospirillum* جداسازی شدند. جدایه‌های مذکور براساس آزمون‌های تکمیلی شامل توانایی رشد در محیط NFb نیمه‌جامد حاوی 3 درصد کلرید سدیم، نیازمندی به بیوتین و توان استفاده از قند گلوکز به سه گونه منسوب به *A. brasilense*، *A. lipoferum* و *A. irakense* تفکیک شدند. نتایج حاصل از آزمون توان تثبیت نیتروژن نشان داد که بین جدایه‌های بومی مختلف از نظر توان احیای استیلن به اتیلن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول 1).

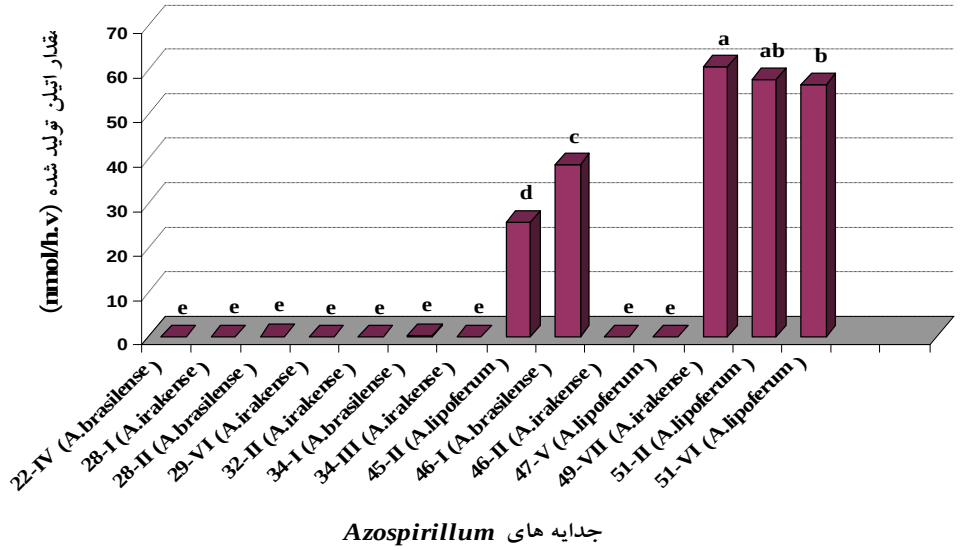
---
۱. Biological Nitrogen Fixation (BNF)
۲. Nitrogenase
۳. Acetylene Reduction Assay (ARA)
۴. Gas Chromatograph (GC)
۵. Nitrogen Free Blue (NFb)

جدول 1- تجزیه واریانس توان تثبیت نیتروژن توسط جدایه‌های *Azospirillum*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تکرار	2	1/706 ^{ns}	0/44
جدایه‌های *Azospirillum*	15	1765/032**	456/63
خطا	30	3/73	
ضریب تغییرات		13/083	

**و^{ns} به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد و عدم تفاوت معنی‌دار

نتایج مقایسه میانگین (شکل 1) بیانگر این بود که بیشترین میزان نیتروژن تثبیت شده در بین جدایه‌های بومی *Azospirillum*، مربوط به جدایه‌های VII-49، II-51 و VI-51 به ترتیب با مقادیر 60/64، 57/707 و 56/706 نانومول اتیلن در ساعت در میلی‌لیتر می‌باشد.



شکل1- میزان تثبیت نیتروژن به روش احیای استیلن در بین جدایه‌های بومی *Azospirillum*

در نهایت می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که از بین 14 جدایه انتخابی برای این آزمون، 35/71 درصد از جدایه‌های بومی *Azospirillum* توانایی تثبیت نیتروژن بالای 25 نانومول را داشتند که 7/14 درصد مربوط به گونه *A. brasilense*، 21/43 درصد مربوط به گونه *A. lipoferum* و 7/14 درصد مربوط به گونه *A. irakense* بودند. نتایج حاصله از این تحقیق مطابق با مطالعات سایر محققان بود. به طوری‌که بررسی‌های روستا (1375) نشان داد که در بین گونه‌های مختلف *Azospirillum* تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری وجود دارد و جدایه‌های بومی نسبت به جدایه‌های خارجی از توانایی بالاتری در امر تثبیت نیتروژن برخوردار بودند. مطالعات عرب (1385) بر روی جدایه‌های بومی *Azospirillum* جدا شده از ریشه غلات در سطح استان‌های تهران، گلستان و خوزستان حاکی از آن بود که در حدود 55 درصد از جدایه‌ها توان احیای استیلن در محدوده 4/61 تا 73/15 نانومول در ساعت را داشتند. تحقیقات

ارزانش (1387) نیز بر روی جدایه‌های بومی *Azospirillum* خاک‌های تحت کشت گندم در ایران نشان داد که گونه *A. brasilense* دارای بیشترین فراوانی نسبت به سه گونه دیگر (*A. lipoferum*، *A. irakense* و *A. halopraeferens*) با توانایی تثبیت نیتروژن بیشتر از سویه‌های استاندارد بودند. نتایج آزمایشات محمدی (1388) بر روی دو گونه *A. brasilense* و *A. chrococcum* نشان داد که هر دو گونه مذکور توانایی احیای استیلن را داشتند ولی مقدار اتیلن تولید شده در *A. brasilense* بیشتر و برابر 8/1 نانومول در ساعت در میلی‌لیتر بود، در حالیکه در گونه *A. chrococcum* برابر با 6/8 نانومول در ساعت در میلی‌لیتر بود.

منابع

ارزانش م ح، 1387. بررسی پتانسیل کاربرد برخی از جدایه‌های آزوسپیریلومی محرک رشد گیاه بر عملکرد گندم (*Triticum aestivum* L.) در سطوح مختلف خشکی. رساله دکتری تخصصی. دانشکده مهندسی آب و خاک، گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران. 208 صفحه.

بی‌نام. 1387. آمارنامه کشاورزی. دفتر آمار و فناوری اطلاعات. معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی. وزارت کشاورزی.

خاوازی ک و ملکوتی م ج، 1380. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور (مجموعه مقالات). وزارت جهاد کشاورزی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب. صفحات 1 تا 55.

روستا م ج، 1375. بررسی فراوانی و فعالیت آزوسپیریلوم در برخی از خاک‌های ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.

شهیدی ا و فروزان ک، 1376. کلزا. نشر شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی. چاپ اول، تهران، 51 صفحه.

عرب س م، 1385. بررسی مؤلفه‌های محرک رشدی جدایه‌های بومی باکتری‌های جنس *Azospirillum* و اثرات تلقیح انواع برتر آنها بر روی شاخص‌های رشد، عملکرد و اجزای عملکرد گیاه ذرت شیرین. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده تولیدات گیاهی و دامی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران. 155 صفحه.

محمدی ر، 1388. مقایسه اثرات کود اوره، مواد آلی و باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) بر عملکرد و برخی خصوصیات رشد گندم رقم الوند. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. 108 صفحه.

Dobereiner J and Day JM, 1976. Associative symbiosis and free-living systems. In: Newton, W. E., Nyman, C. J. (eds.) Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press, Pullman. pp. 518-538.

Kim J and Rees DC, 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochemistry 33: 389-397.

Masepohl B and Klipp W, 1996. Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. Archives in Microbiology 165: 80-90.

Okon Y and Labandera-Gonzalez CA, 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 26: 1591-1601.

Pöttker D, 2000. Recentes avanços no manejo. químico do solo para a cultura do milho. In: Sandini, I. E. and Fancelli, A. L. (eds.). Milho: Estratégias de manejo para a região sul. Guarapuava, Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária. pp. 63-87.

Turner GL and Gibson AH, 1980. Measurements of nitrogen fixation by indirect means. In: Methods for evaluating biological nitrogen fixation, F. J. Bergerson (Ed.), John Wiley and Sons. New York pp. 111-138.