جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری ویژگی‌های افزایندگی رشد جدایه‌های ازتوباکتر از نمونه خاک‌های شمال‌غرب کشور با کاربری گوناگون

میترا ابراهیمی[1*]، علی اکبر صفری سنجانی[2]، محمدرضا ساریخانی[3]، سید ابوالقاسم محمدی[4]، ناصر علی‌اصغرزاد[5]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۱)

چکیده

ازتوباکتر از باکتری‌های آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن در خاک بوده که از راه‌های گوناگونی مایه افزایش رشد گیاه می‌شود. فراوانی و فعالیّت آن‌ها در خاک وابسته به ویژگی‌های خاک و کاربری آن است. بر این پایه برای جداسازی و شناسایی برخی از ازتوباکترهای افزاینده رشد گیاه، ۵۰ نمونه خاک به گونه بختانه از کاربری‌های گوناگون در سه استان آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان از لایه صفر تا ۲۵ سانتی‌متری خاک نمونه‌برداری شد. برای جداسازی ازتوباکترها از روش خمیره خاک بهره‌گیری شد و ناب‌سازی آن‌ها با استفاده از کشتگاه LG و Nutrient Agar انجام گرفت. در این بررسی در آغاز ۵۰ جدایه جداسازی شد که بر پایه ویژگی‌های فنوتیپی و ریخت‌شناسی جدایه‌ها و چگونگی رشد آن‌ها در کشتگاه‌های یادشده، جدایه‌های همانند کنار گذاشته شده و شناسایی نه جدایه به نام‌های 2SP-5، 14SPI، 14SP2-1، 16SP-2، 34SPIII، 35SP، 35SP-2، 43SP-2 و 44SP-2 همراه با آزمون توانایی افزایندگی رشد آنها انجام شد. نتایج شناسایی مولکولی (16S rDNA) نشان داد که از میان نه جدایه، پنج جدایه 14SPI، 14SP2-1، 16SP-2، 35SP و 44SP-2 ازتوباکتر کروکوکوم بوده و جدایه 34SPIII و 35SP-2 سودوموناس و جدایه 2SP-5 و 43SP-2 بیجرینکیا شناخته شدند. یافته‌های بررسی ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه نیز نشان داد که بیش‌ترین تثبیت نیتروژن در ازتوباکتر کروکوکوم جدایه 14SP2-1 به‌دست آمد و بالاترین توانایی حل کنندگی فسفر و ساخت اکسین در باکتری سودوموناس جدایه 34SPIII دیده شد. از دیدگاه آزادسازی پتاسیم نیز باکتری‌های ازتوباکتر کروکوکوم جدایه 44SP-2 و 14SP2-1 توانایی بالاتری نشان دادند. ازتوباکترهای به‌دست آمده همگی متعلق به گونه ازتوباکتر کروکوکوم بودند که از نمونه خاک‌های دو استان آذربایجان شرقی و گیلان با کاربری پوشش مرتعی و شالیزار به دست آمدند.

واژه‌های کلیدی: باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن، خمیره خاک، شناسایی مولکولی باکتری، ویژگی افزآیندگی رشد گیاه

۱- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم خاک دانشگاه بوعلی سینا همدان (مکاتبه کننده)
۲- استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم خاک دانشگاه بوعلی سینا همدان
۳- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز
۴- استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشگاه تبریز
۵- استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز
* پست الکترونیک: mtrr_ebrahimi@yahoo.com

مقدمه

در بیش‌تر سیستم‌های کشاورزی، نیتروژن به اندازه‌ای بسنده در خاک نبوده و کمبود آن مایه کاهش رشد و فرآورده‌های کشاورزی می‌شود. با اینکه فراوانی نیتروژن در اتمسفر، بالا است ولی گیاهان توان بهره‌گیری از آن را ندارند. برای فراهم‌آوری و دسترسی نیتروژن برای گیاهان بایستی طی فرآیند تثبیت شیمیایی یا زیستی، نیتروژن به ریخت آمونیم درآید (Fageria, 2009). یکی از راهکارهای زیستی برای افزایش کارکرد گیاهان، بهره‌گیری از توان ریزجانداران سودمند خاکزی است. توانایی تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی و ساخت مواد افزآینده رشد گیاه از توانایی‌های این گروه از ریزجانداران است. باکتری‌های دی‌آزوتروف از مهم‌ترین ریزوباکترهای افزآینده رشد گیاه می‌باشند. ریزوباکترهای افزآینده رشد گیاه، گروه بزرگی از باکتری‌ها هستند که در ریشه سپهر[1]، سطح ریشه[2] و هیستوسفر به گونه مستقیم و/یا غیرمستقیم مایه افزایش رشد و کارکرد گیاهان می‌شوند. این گروه از ریزجانداران در بخش‌های گوناگون ریشه توان لازم برای زندگی در زیستگاه‌های وابسته به ریشه گیاهان را دارا می‌باشند (Vessey, 2003). مهم‌ترین تثبیت‌کنندگان هتروتروف، هوازی و آزادزی نیتروژن، باکتری‌های جنس ازتوباکتر، درکسیا و بیجرینکیا می‌باشد (Kennedy *et al*., 2005). ازتوباکتر توانایی تثبیت نیتروژن را دارد و می‌تواند انواع اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و هورمون‌های افزآینده رشد گیاه و انواع اگزوپلی ساکاریدها را بسازد (Khosravi, 2013). این جنس باکتری از گروه گاما-پروتئوباکترها[3] بوده و هفت گونه از آن شناسایی شده است (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Jiménez *et al*., 2007) که در میان آن‌ها گونه ازتوباکتر کروکوکوم در خاک‌های آهکی فراوان‌تر می‌باشد (Harris, 1973). بنا به ویژگی‌های سودمند این باکتری و توان افزایندگی رشد گیاه، در این بررسی پس از جداسازی و شناسایی این گروه از باکتری‌ها، به بررسی برخی از ویژگی‌های افزایندگی رشد آن‌ها پرداخته شده است. برای کشت و جداسازی آن‌ها بهره‌گیری از خمیره خاک و کشتگاه‌های بدون نیتروژن (مانند Burk، Brown، Winogradsky، Jensen، Ashby، Beijerinckia) از روش‌های مرسوم بوده که به گونه جداگانه یا همراه هم، و با غنی‌سازی نخستین این باکتری‌ها یا بدون آن بکار می‌روند (Aquilantia *et al*., 2004; Kennedy *et al*., 2005). از آنجایی که ازتوباکترها توان افزایش رشد گیاه را دارند برای بهره‌جستن از آن‌ها در کشاورزی پایدار، پژوهش‌های بسیاری در دنیا و در کشور انجام شده است. در این راستا، فرجزاده و همکاران (Farajzadeh *et al*., 2012) در بررسی خود با جداسازی ۱۷ ازتوباکتر بومی دشت تبریز و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی آن‌ها نشان دادند که این باکتری‌ها بیش‌تر از دو گونه ازتوباکتر وینلاندی و ازتوباکتر کروکوکوم می‌باشند. در این بررسی ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه مانند توان حل فسفات آلی و معدنی، ساخت سیدروفور و اکسین، ساخت پروتئاز و کیتیناز به‌صورت کیفی و هم‌چنین توانایی ساخت ACC دِآمینازی جدایه‌ها نیز بررسی شد. همه سویه‌ها از دیدگاه ساخت اکسین و ویژگی حل فسفات توانمند بودند. بالاترین قطر هاله به قطر کلنی در حل کنندگی فسفات معدنی و آلی به ترتیب با مقادیر شش و ۵/۷ مربوط به ازتوباکتر وینلاندی بود.

بهروز و همکاران (Behrooz *et al*., 2016) به جداسازی و ارزیابی ویژگی‌های افزایندگی رشد برخی از جدایه‌های ازتوباکتر بومی خاک‌های استان گلستان پرداختند. ایشان ویژگی‌های افزایندگی رشد مانند تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی، توان حل فسفر و پتاسیم، ساخت هورمون اکسین و سیدروفور را اندازه‌گیری کردند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که از میان ۴۳ جدایه ازتوباکتر جداسازی شده، بیش‌ترین مقدار تثبیت زیستی نیتروژن مربوط به جدایه شماره سه (۲۷۶ نانومول بر ساعت)، بیش‌ترین توان حل کنندگی فسفر به مقدار ۲۳۲ میلی‌گرم در لیتر برای جدایه شماره ۲۵، بیش‌ترین توان آزادسازی کمّی 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 آزمون توان تولید نیمه کمّی سیدروفور مربوط به جدایه‌های شماره ۴، ۹، ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۷، ۳۸، ۴۰، ۴۱ و ۴۳ بوده است. رجایی و همکاران (Rajaie *et al*., 2005) پس

1. Rhizosphere
2. Rhizoplane
3. γ-proteobacteria

از نمونه‌برداری از ریزوسفر گندم‌زارهای استان چهارمحال و بختیاری به شمارش ازتوباکتر پرداخته و پس از جداسازی و ناب‌سازی جدایه‌ها با بهره‌گیری از کشتگاه Winogradsky، با انجام آزمون‌های درون شیشه‌ای توان افزایندگی رشد آن‌ها را ارزیابی کردند. در میان ۷۱ سویه ازتوباکتر کروکوکوم مورد بررسی، تنها ۳۴ درصد توان تثبیت نیتروژن مولکولی را داشتند که بیش‌ترین میزان مربوط به سویه AZT-5 (۸/۳ نانومول بر ساعت) و کم‌ترین آن در سویه AZT-60 (دو نانومول بر ساعت) مشاهده شد. در آزمون نیمه کمّی توان ساخت سیدروفور، سویه‌های AZT-23 و AZT-26 بیش‌ترین میزان ساخت سایدروفور را داشتند. بیش‌ترین میزان ساخت ایندول استیک اسید مربوط به سویه AZT-25 (۷۲ میلی‌گرم بر لیتر) به دست آمد. ولی سویه‌های جداشده توان حل فسفات چندانی نداشتند.

تجرا و همکاران (Tejera *et al*., 2005) از کشتگاه بدون نیتروژن Burk برای جداسازی باکتری‌های جنس ازتوباکتر بهره گرفتند و پس از غنی‌سازی نخستین باکتری‌ها در کشتگاه یاد شده، آن‌ها را جداسازی نمودند. شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های جداشده نشان داد که جدایه‌های به‌دست آمده از گونه‌های ازتوباکتر کروکوکوم و آزوسپریلوم برازیلنس می‌باشد. احمد و همکاران (Ahmad *et al*., 2008) ۷۲ جدایه باکتری از جمله جنس ازتوباکتر را از خاک‌های ریزوسفری و گره ریشه گیاهان جداسازی نمودند. آن‌ها از کشتگاه Jensen برای جداسازی ازتوباکتر بهره‌گیری کردند. این جدایه‌ها در آزمون درون شیشه‌ای از دیدگاه ساخت ایندول استیک اسید، آمونیاک، سیانید هیدروژن، سیدروفور، حل فسفات و توان ضدقارچی بررسی و ارزیابی شدند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که از میان ۷۲ جدایه، ۱۱ جدایه (هفت ازتوباکتر، سه سودوموناس و یک باسیلوس) توان بهتری در برابر دیگر جدایه‌ها داشتند. روش‌های گوناگونی برای جداسازی ازتوباکترها بکار گرفته شده است، مانند ساخت سری رقت از سوسپانسیون خاک و بهره‌گیری از کشتگاه‌های بدون نیتروژن (Motsara & Roy, 2008)، به هر گونه، بیش‌تر پژوهش‌گران روش خمیره خاک را در کنار بهره‌گیری از کشتگاه بدون نیتروژن روش شایسته‌ای دانسته‌اند (Aquilantia *et al*., 2004). به گونه‌ای که در یک بررسی اکوالینتیا و همکاران (Aquilantia *et al*., 2004) با نمونه‌برداری از ۳۵ نمونه خاک در بخش مرکزی ایتالیا و با کاربرد سه روش جداسازی و غربالگری، ۱۹۶ باکتری گِرم منفی جداسازی کردند. سه روش بکار رفته ۱) کشت زیگزاگی از رقت‌های سوسپانسیون خاک روی کشتگاه بدون نیتروژن Brown ۲) غنی‌سازی در محلول Winogradsky برای هفت تا ۱۴ روز و سپس انجام کشت خطی بر روی کشتگاه Brown ۳) بهره‌گیری از خمیره خاک در ظرف پتری یا کشت خاکدانه‌های خاک بر روی کشتگاه آگار بود. این بررسی نشان داد که غربالگری نمونه‌ها به روش کشت خمیره خاک در ظرف پتری به همراه جداسازی باکتری‌ها روی مانیتول-آگار برای جداسازی این باکتری‌ها روش بهتری است. افزون بر آن، شناسایی و کشت تثبیت‌کنندگان نیتروژن روی کشتگاه LG به جداسازی باکتری‌های همانند ازتوباکتر از دیدگاه ریخت‌شناسی کمک‌کننده است.

هدف از این پژوهش جداسازی جدایه‌های ازتوباکتر با توانایی افزایندگی رشد گیاه با بهره‌گیری از روش خمیره خاک بود. با نگاه به جایگاه و اهمیت ازتوباکترها و نیاز به شناخت توانایی‌های گونه‌های بومی مناطق گوناگون کشور و شناسایی توان افزایندگی رشد گیاه آن‌ها، از خاک‌های گوناگون سه استان با آب و هوایی ویژه در کشور نمونه‌برداری شد تا با انجام آزمایش‌های درون شیشه‌ای جدایه‌های برتر شناسایی شوند و بتوان آن‌ها را برای آزمایش‌های گلدانی و مزرعه‌ای برای هر زیستگاه نامزد نمود تا در آینده‌ای نزدیک بتوان برای بهره‌گیری از آن‌ها با ساخت کودهای زیستی کارهای پژوهشی ویژه‌ای انجام داد. هر چند کودهای زیستی گوناگونی همانند نیتراژین، بیوفارم، کارا و نیتروکسین در این زمینه در کشور ساخته و به بازار آمده است اما برای بهره‌گیری از کودهای زیستی دشواری‌های گوناگونی پیش روی کشاورزان است. ناکارمدی باکتری‌ها، ناسازگاری آن‌ها به دلیل انجام نشدن پژوهش‌های میدانی در کشتزارها، شمار کم پژوهش‌های اجرایی در کشتزارها (Khosravi, 2013) و هم‌چنین ناآگاهی با شیوه درست بکارگیری و گران بودن کودهای زیستی از این دشواری‌ها است که کشاورزان را بیش‌تر به سوی خرید کودهای شیمیایی می‌کشاند. از آنجایی که توانایی

ریزجانداران خاک بسته به گوناگونی آن‌ها بسیار ناهمانند است و گونه‌ها و جدایه‌های توانمند تنها محدود به یک یا چند گونه نیست، کشت، جداسازی، غربالگری و شناسایی جدایه‌های برتر از نمونه‌های خاک برای دستیابی به جدایه‌های کارآمد می‌تواند بسیار کارگشا و سودمند باشد و انجام پژوهش در این زمینه باید ادامه یابد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این پژوهش ۵۰ نمونه خاک از استان‌های آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان نمونه‌برداری شد. نمونه‌های برداشت شده شامل ۳۷ نمونه از استان آذربایجان شرقی، پنج نمونه از استان اردبیل و هشت نمونه از استان گیلان بودند. نمونه-های خاک از لایه صفر تا ۲۵ سانتی‌متری خاک‌های زیر کشت گیاهانی مانند گندم، جو، ذرت، برنج، لوبیا، یونجه و نیز خاک چراگاه‌ها، زمین‌های آیش و جنگل‌زارهای سوزنی‌برگ و پهن‌برگ برداشت شدند و در درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه رسانده شدند. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های نمونه‌برداری شده (Gee & Bauder, 1986) در جدول ۳ آورده شده است.

جداسازی و ناب‌سازی ازتوباکتر

برای جداسازی ازتوباکترها و ناب‌سازی کشت آن‌ها از روش خمیره خاک در ظرف پتری[1] بهره‌گیری شد (Aquilantia *et al.*, 2004). برای این کار ۵۰ گرم از هر نمونه خاک برداشته شد و با ۰/۵ گرم از پیرووات سدیم همانند منبع قندی باکتری‌ها، آمیخته شد و و رویه خمیره با کاردک به‌خوبی هموار شد تا درخشنده شود. سپس همه نمونه‌ها درون انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس برای یک هفته نگه‌داری شدند تا رشد ازتوباکترها انجام شود. پس از سپری شدن زمان یاد شده ازتوباکترها به گونه لکه‌های رنگی قهوه‌ای و سیاه بر روی خاک آشکار شدند (شکل ۱). برای ناب‌سازی کشت آن‌ها از کشتگاه بدون نیتروژن LG و سپس از کشتگاه Nutrient Agar بهره‌گیری شد (Safari Sinegani *et al.*, 2010). بدین گونه جداسازی ازتوباکترها از همه نمونه خاک‌ها انجام شد و کلکسیونی از باکتری‌ها به دست آمد. در این بخش توان ساخت رنگدانه و کیست جدایه‌ها در کشتگاه‌های یاد شده (Motsara & Roy, 2008) بررسی و آزمون شد (شکل ۱).

شناسایی باکتری به روش آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی (16S rRNA)

پس از جداسازی باکتری‌ها و ناب‌سازی کشت آن‌ها، شناسایی هر یک از جدایه‌ها به گونه زیر انجام شد. همزمان با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، شناسایی مولکولی سویه‌ها انجام شد. برای این کار با بهره‌گیری از آغازگرهای عمومی 24F (5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’) و 1525R (5’ AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3’) و به کمک PCR قطعه DNA ژنومی رمزکننده 16S rRNA فراوان‌سازی شد. توالی‌یابی ژن‌ها را شرکت ژن‌فناوران انجام داد. پس از شناخت توالی 16S rDNA به کمک سایت NCBI[2] و بهره‌گیری از BLAST[3] و بررسی هم‌ردیفی توالی، جنس و گونه باکتری شناسایی شد (Altschul *et al.*, 1997). همزمان آزمون‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های ناهمانندساز شایسته آن باکتری بر پایه یافته‌های شناسایی مولکولی برای کامل کردن شناسایی آن‌ها انجام شد. برای باکتری‌های برگزیده رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های بیوشیمیایی گوناگونی مانند آزمون کاتالاز، اکسیداز، توان بهره‌گیری از قندها (گلوکز، مانیتول، گلیسرول، ساکارز)، آزمون آنزیم‌ها (ژلاتیناز، تریپتوفاناز، آمیلاز، اوره‌آز) انجام شد (Seeley & Vandemark, 1970).

اندازه‌گیری ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه جدایه‌ها

در این بررسی در آغاز ۵۰ جدایه جداسازی شد که بر پایه ویژگی‌های فنوتیپی و ریخت‌شناسی جدایه‌ها و چگونگی رشد آن‌ها در کشتگاه‌های یادشده، جدایه‌های همانند کنار گذاشته شدند و شناسایی نه جدایه به نام‌های 2SP-5، 14SPI، 14SP2-1، 16SP-2، 34SPIII، 35SP، 35SP-2، 43SP-2 و 44SP-2 همراه با آزمون توانایی افزایندگی رشد آن‌ها (آزمون توان تثبیت نیتروژن، آزمون توان حل‌کنندگی فسفات معدنی، آزمون کمّی توان رهاسازی

1- Soil paste-plate

2- National Center for Biotechnological Information

3- Basic Local Alignment Search Tool

پتاسیم از کانی‌های میکا، توان ساخت اکسین و آزمون کیفی ساخت سیدروفور) انجام شد.

آزمون توان تثبیت نیتروژن به روش کجلدال

توانایی تثبیت نیتروژن جدایه‌های به‌دست آمده به روش کجلدال بررسی شد. از کشتگاه LG جامد بهره‌گیری شد که هیچ‌گونه نیتروژنی ندارد. پس از هفت روز انکوباسیون، همه کشتگاه با باکتری‌های رشد یافته بر آن درون فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتری کجلدال ریخته شد و با افزودن آمیخته نمک‌های (50:10:1 K_2SO_4, $CuSO_4$ and metallic selenium) و سه میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ، گوارش نمونه انجام شد و برپایه روش کجلدال، نمونه برای اندازه‌گیری نیتروژن آماده شد. هم‌زمان با نمونه‌ها، نمونه کنترل بدون کشت باکتری نیز گذاشته شد (Kanimozhi & Panneerselvam, 2010).

ارزیابی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش کیفی و کمّی

برای انجام آزمون کیفی از کشتگاه جامد Sperber (Sperber, 1985) بهره‌گیری شد. هر ظرف پتری برای هر جدایه در سه تکرار مایه‌زنی شد. سپس در درون انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس نهاده شد. همه شیشه‌ها در سه نوبت ۴، ۸ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی از انکوباتور بیرون برده و قطر پرگنه (کلنی) رشد یافته و نیز قطر هاله شفاف پیرامون پرگنه پدید آمده از حل کانی تری‌کلسیم فسفات به دقت اندازه‌گیری شد، میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی در روز دوازدهم برای هر جدایه برآورد شد. برای آزمون کمّی از کشتگاه Sperber مایع با بهره‌گیری از دو کانی فسفری (تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات) استفاده شد. ارلن‌های دارای کشتگاه مایع Sperber با کشت شبانه هر جدایه (کشت شده در NB با چگالی نوری ۰/۸) در سه تکرار مایه‌زنی شده و به همراه نمونه کنترل بدون تلقیح در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۶ درجه سلسیوس برای یک هفته نگهداری و با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس از سوسپانسیون‌های کشتگاه دو میلی‌لیتر برداشته شد و با دور ۱۳۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن فسفر محلول در مایع روشن رویین به روش وانادات-مولیبدات اندازه‌گیری شد (Cotteni, 1980).

آزمون کمّی توان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا

توان رهاسازی پتاسیم هر جدایه با سه تکرار در کشتگاه Aleksandrov مایع در حضور کانی بیوتیت یا موسکویت آزمون شد. در آغاز کشت شبانه باکتری‌ها در کشتگاه NB با چگالی نوری ۰/۸ انجام شد و ارلن‌های دارای کشتگاه مایع Aleksandrov با کشت شبانه هر جدایه در سه تکرار مایه‌زنی شده و به‌همراه نمونه کنترل بدون تلقیح در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۶ درجه سلسیوس برای یک هفته نگهداری و با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، دو میلی‌لیتر از کشتگاه یاد شده، برداشته شد و با دور ۱۳۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس از بخش روشناور و آبگونه روشن رویین برای اندازه‌گیری پتاسیم آزاد شده بهره‌گیری شد (Sarikhani *et al*., 2016).

آزمون کمی توان ساخت اکسین

توان ساخت ایندول استیک اسید جدایه‌های برگزیده، با بهره‌گیری از کشتگاه مایع LG بهسازی شده، فاقد برموتیمول بلو و دارای نیتروژن (یک گرم در لیتر کلریدآمونیوم) بهره‌گیری شد (Safari Sinegani *et al*., 2010). ارلن‌های دارای کشتگاه مایع LG دارای ۱۰۰ میلی-گرم در لیتر اسید آمینه L-تریپتوفان با کشت شبانه هر جدایه (کشت شده در NB با چگالی نوری ۰/۸) در سه تکرار مایه‌زنی شده و به‌همراه نمونه کنترل بدون تلقیح در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۶ درجه سلسیوس برای یک هفته نگه‌داری و با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد. پس از یک هفته دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری، سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور برای ۱۰ دقیقه) و یک میلی‌لیتر از آبگونه روشن رویین با چهار میلی‌لیتر شناساگر سالکوفسکی (۵۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱۲ مولار، ۱۰۰ میلی‌لیتر کلرید آهن (III) ۰/۵ مولار، که به حجم یک لیتر رسانده شده است) آمیخته شد. این آمیخته برای ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داشته و سپس جذب نور با طول موج ۵۲۵ نانومتر با بهره‌گیری از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و توان ساخت ایندول استیک اسید هر جدایه از سنجش جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد آماده شده

در غلظت‌های صفر، ۵ ،۱۰، ۱۵ ،۲۰ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید برآورد شد (Deaker *et al*., 2011).

آزمون کیفی ساخت سایدروفور

توان ساخت سایدروفور جدایه‌های برگزیده، با بهره‌گیری از کشتگاه Chrome azurol S (CAS) در درون ظرف پتری آزمون شد (Schwyn & Neilands, 1987). برای هر جدایه باکتری یک ظرف پتری که رویه هر پتری به سه بخش برابر جدا شده بود بهره‌گیری شد. روش کار همانند آزمون کیفی حل فسفات بود با این تفاوت که همه ظرف پتری‌ها در سه نوبت یک، سه و پنج روز پس از مایه‌زنی از انکوباتور بیرون آورده شد و پیدایش رنگ نارنجی در پیرامون پرگنه‌ها و شدت آن به گونه کیفی ارزیابی شد.

طرح آماری و تجزیه داده‌ها

برای ارزیابی توان تثبیت نیتروژن جدایه‌ها، از طرح کاملاً تصادفی بهره‌گیری شد. آزمایش‌های دیگر به گونه فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار به انجام رسید. در آزمایش توان حل فسفات فاکتورها شامل باکتری و منابع فسفر (تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات)، در آزمایش توان آزادسازی پتاسیم فاکتورها شامل باکتری و منابع میکا (بیوتیت و موسکویت) و در آزمایش ساخت اکسین فاکتورها شامل باکتری، وجود و عدم وجود تریپتوفان بودند. پردازش داده‌ها در پایان آزمایش به کمک نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد و میانگین‌ها به روش دانکن در پایه آماری پنج درصد آزمون شدند.

نتایج و بحث

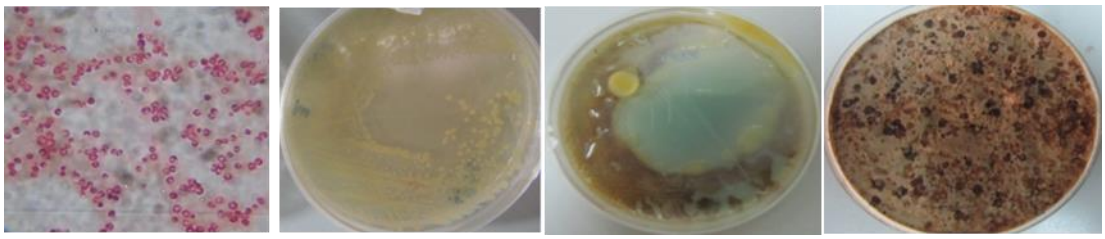
جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

در این پژوهش از خمیره خاک برای جداسازی ازتوباکترهای خاک بهره‌گیری شد و یافته‌ها نشان دادند که در چنین شیوه‌ای، باکتری‌های نزدیک به این جنس، نیز جداسازی می‌شوند. هم‌چنین یافته‌ها نشان داد که به‌دلیل فراوانی گونه ازتوباکتر کروکوکوم در خاک‌های بررسی شده تنها این گونه از جنس ازتوباکتر جداسازی شد و برای دستیابی به دیگر گونه‌ها نیاز به بهره‌گیری از کشتگاه‌های بدون نیتروژن با بهره‌گیری از نمونه خاک‌های گوناگونی دارد. درباره باکتری‌های شناسایی شده بیجرینکیا (2SP-5 و 43SP-2) و سودوموناس (34SPIII و 35SP-2) هر چند در رنگ‌آمیزی گرم آن‌ها کیستی دیده نشد اما الگوی رشد و ساخت رنگ‌دانه در کشتگاه LG از دلایل گزینش این باکتری‌ها بوده است. یافته‌های به‌دست آمده از بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی این نه جدایه در جدول ۱ آورده شده است.

آزمون توان تثبیت نیتروژن

در این بررسی توانایی تثبیت نیتروژن پنج جدایه ازتوباکتر کروکوکوم، دو جدایه سودوموناس و دو جدایه بیجرینکیا به روش کجلدال در کشتگاه جامد LG آزمون شد. پس از کشت جدایه‌های باکتریایی برگزیده در کنار تیمار کنترل (کشتگاه بدون باکتری)، و اندازه‌گیری نیتروژن پدید آمده در یکان وزن خشک کشتگاه دیده شد که پیامد توان جدایه‌ها بر نیتروژن پدید آمده در پایه آماری یک درصد چشم‌گیر است. در آزمون میانگین‌ها در پایه آماری پنج درصد دیده شد که در میان جدایه‌ها، بیش‌ترین توانایی تثبیت نیتروژن را ازتوباکتر کروکوکوم جدایه 14SP2-1 با میانگین ۱۲۹/۳ میکروگرم نیتروژن بر هر گرم از کشتگاه داشت (شکل ۲). پس از آن جدایه‌های 44SP-2، 35SP-2، 14SP-I و 34SPIII به ترتیب با میانگین۱۰۴/۲، ۹۹/۴۹، ۷۷/۳۸ و ۳۹/۵۴ میکروگرم بر گرم کشتگاه، توانایی بالاتری داشتند. گذشته از ازتوباکتر کروکوکوم جدایه 14SP2-1 ناهمانندی نیتروژن کشتگاه همه آن‌ها با کنترل از دیدگاه آماری چشم‌گیر نبود و همه در یک کلاس آماری بودند (شکل ۲). این شاید به وجود نیتروژن در زیستگاه باکتری‌ها وابسته باشد. هر چند که تلاش شد از موادی با درجه آزمایشگاهی (آنالیتیکال) بهره‌گیری شود، ولی در نمونه شاهد در پایان آزمایش همانگونه که دیده می‌شود نزدیک ۲۰ میکروگرم بر گرم نیتروژن اندازه‌گیری شد. کنیموزی و پانیرسلوام (Kanimozhi & Panneerselvam, 2010) به بررسی توانایی تثبیت نیتروژن ۳۰ جدایه آزوسپیریلوم به روش میکروکجلدال پرداختند. آن‌ها در بررسی خود دریافتند که از میان ۳۰ جدایه، ۲۸ جدایه توانایی تثبیت نیتروژن دارد. اندازه تثبیت نیتروژن از ۳/۳ تا ۱۵/۶ میلی‌گرم نیتروژن بر گرم کشتگاه بود. روبیو و همکاران (Rubio *et al*., 2013) پس از بررسی گوناگونی ژنتیکی و ویژگی‌های افزاینده

رشدی ازتوباکترهای جداشده از نمونه خاک‌های آرژانتین گزارش کردند که بیش‌تر جنس‌های ازتوباکتر توانایی بالایی به‌ویژه در تثبیت نیتروژن و ساخت فیتوهورمون‌ها دارند. افزایش در کارکرد و غلظت نیتروژن در گیاه به توانایی تثبیت نیتروژن باکتری‌ها وابسته است. کیزیل‌کایا (Kizilkaya, 2008) در آزمایش گلدانی و کشتزاری خود نشان داد که مایه‌زنی گندم با باکتری ازتوباکتر کروکوکوم پیامد چشم‌گیری در اندازه غلظت نیتروژن دانه گندم داشت که این به توانایی تثبیت نیتروژن باکتری مایه‌زنی شده برمی‌گردد.



شکل ۱- نمونه‌ای از رشد ازتوباکتر، جداسازی و ناب‌سازی آن. به ترتیب (از راست به چپ) خمیره خاک و رشد ازتوباکتر، ناب‌سازی در کشتگاه LG و Nutrient Agar، ساخت رنگ‌دانه قهوه‌ای، رنگ‌آمیزی گرم و ساخت کیست

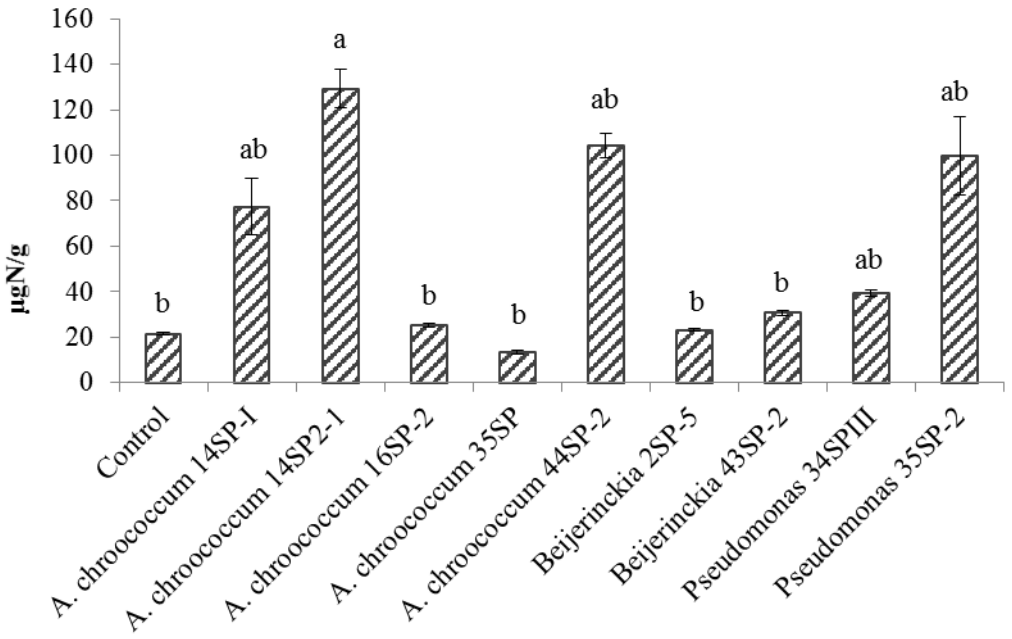
Figure 1. Isolation and purification process of *Azotobacter* from soil samples, growth and pigment formation of Azotobacter on soil paste and LG media and gram staining and observing of cyst (from right to left)

جدول ۱- پاسخ‌های جدایه‌ها در آزمون‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی (16S rDNA) آن‌ها

Table 1. Biochemical and molecular (16S rDNA) identification of bacterial isolates

Molecular identification	Amylase	Manitol	Sucrose	Glyserol	Lactose	Glucose	Urease	Nitrate Reductase	Catalase	Oxidase	Gelatinase	Citratase	Tryptophanase	Isolate
A. chroococcum	+	-	+	-	-	-	+/-	-	+	-	-	+	-	14SP-I
A. chroococcum	-	-	-	-	-	-	+	+	+	ND	-	-	-	14SP2-1
A. chroococcum	-	-	+	-	-	-	-/+	-	+	+	-	+	-	16SP-2
A. chroococcum	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	35SP
A. chroococcum	-	-	+/-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	44SP-2
Beijerinckia sp.	-	-	+/-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	2SP-5
Beijerinckia sp.	-	ND	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	43SP-2
Pseudomonas sp.	-	-	-	-	-	+	+	-	+	ND	-	+	-/+	34SPIII
Pseudomonas sp.	ND	+	-	-	-	-	-/+	+	+	+	-	-	-	35SP-2

- پاسخ آزمون انجام شده منفی می‌باشد، + پاسخ آزمون انجام شده مثبت می‌باشد، -/+ پاسخ آزمون انجام شده نه مثبت و نه منفی ولی بیش‌تر مانند پاسخ مثبت می‌باشد، +/- پاسخ آزمون انجام شده نه مثبت و نه منفی ولی بیش‌تر همانند پاسخ منفی می‌باشد، ND این آزمون انجام نشد.



شکل ۲- توان تثبیت نیتروژن جدایه‌های برگزیده به روش کجلدال

Figure 2. Nitrogen fixation ability of bacterial isolates by Kjeldahl method

جدول ۲- آزمون میانگین ویژگی‌های افزآیندگی رشد گیاه در جدایه‌های برگزیده ازتوباکتر، بیجرینکیا و سودوموناس

Table 2. Mean comparison of plant growth promoting properties of selected Isolates belonged to *Azotobacter*, *Beijrinckia* and *Pseudomonas*

Isolate		P solubility		K releasing ability		IAA production		Qualitative indices	
		(mg l^{-1})							
	Molecular identification	TCP	RP	Biotite	Muscovite	-Trp	+Trp	Siderophore	HD/CD
blank	-	84.43 d	12.54 f	13.38 cd	8.55 ef	3 d-f	3.74 cd	-	-
14SP-I	*A. chroococcum*	126.65 c	4.60 f	15.51ab	8.34 ef	1.94 e-h	1.09 gh	+	1.28
14SP2-1	*A. chroococcum*	162.64 b	5.85 f	16.05 ab	8.57 ef	0.94 h	1.83 fh	+	1.52
16SP-2	*A. chroococcum*	167.16 ab	10.45 f	4.90 g	1.52 h	3.57 cd	2.5 d-g	+	1
35SP	*A. chroococcum*	162.64 b	6.27 f	14.76 bc	7.43 f	2.01 e-h	2.67 d-f	-	1.7
44SP-2	*A. chroococcum*	165.90 ab	5.02 f	16.55 a	8.55 ef	1.5 f-h	2.5 d-g	+	1.10
2SP-5	*Beijerinckia* sp.	74.83 d	5.02 f	7.50 f	4.49 g	3.39 c-e	3.72 cd	-	1
43SP-2	*Beijerinckia* sp.	82.35 d	5.02 f	4.66 g	2.12 h	2.42 d-h	2.05 e-h	+	1
34SPIII	*Pseudomonas* sp.	176.81 a	30.51 e	13.21 d	8.24 f	5.02 b	10.64 a	+	1.36
35SP-2	*Pseudomonas* sp.	82.35 d	3.34 f	4.22 g	9.93 e	4.61 bc	2.02 e-h	-	1

آزمون توان حل فسفات معدنی

در این بررسی، آزمون حل فسفات به هر دو روش کیفی و کمّی انجام شد. یافته‌های بخش کیفی نشان داد که تنها دو جدایه 35SP و 14SP2-1 دارای بالاترین نسبت قطر هاله به قطر پرگنه (با نسبت بالای ۱/۵) بودند (جدول ۲). اگرچه در گزارش‌های دیگران همبستگی مثبتی میان ساخت هاله روشن در کشتگاه جامد و توان حل‌کنندگی باکتری در کشتگاه مایع دیده می‌شود ولیکن گزارش‌هایی شده است که باکتری‌هایی که در کشتگاه جامد توانایی ساخت هاله نداشته‌اند در کشتگاه مایع از توان حل فسفر بالایی برخوردار

بوده‌اند (Rodríguez& Fraga, 1999). ازاین‌رو سنجش کمّی فسفات از اهمیت بالاتری برخوردار است. تجزیه واریانس داده‌های اندازه‌گیری حل فسفات نشان داد که پیامد جدایه‌ها و گونه کانی فسفات بکار رفته و هم‌چنین برهم‌کنش آن‌ها همگی در پایه آماری یک درصد چشم‌گیر بود. همان‌گونه که پیش‌بینی می‌شد حل فسفر از کانی تری‌کلسیم فسفات بسیار بالاتر از کانی سنگ فسفات بود. میانگین حل فسفات از این دو کانی ۱۲۸/۵ و ۸/۹ میلی‌گرم بر لیتر بود و حل فسفات از تری‌کلسیم فسفات نزدیک ۱۴ برابر بیش‌تر از حل آن از سنگ فسفات بود که وابسته به ویژگی‌های دو کانی است. زیرا حل‌پذیری سنگ فسفات در برابر تری‌کلسیم فسفات بسیار پایین‌تر می‌باشد. در پژوهش‌های متعددی نیز یافته‌های مشابهی گزارش شده است (Rodríguez& Fraga, 1999).

در آزمون میانگین توانایی حل فسفات از دو منبع فسفاته (تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات) دیده شد که بالاترین میانگین را جدایه 34SPIII داشته است (جدول ۲). در این میان جدایه‌هایی بودند که برخی توانایی بالاتری را تنها در حل تری‌کلسیم فسفات (14SP2-1، 16SP-2 و 44SP-2) داشتند. باکتری‌هایی که توان حل فسفر از هر دو کانی را دارند، برای کاربردهای تجاری و ساخت کودهای زیستی سودمندتر خواهند بود. بالاترین حل فسفات را جدایه سودوموناس و پس از آن جدایه‌های ازتوباکتر داشته و کم‌ترین توان را بیجرینکیا داشت. در این میان برخی از جدایه‌ها (2SP-5، 14SPI، 14SP2-1 و 35SP) نه تنها در آزادسازی فسفر کارایی نداشتند بلکه فسفر کشتگاه را نیز در ساختار زی‌توده خود جذب نموده و باعث کاهش فسفر محیط کشت در برابر نمونه کنترل شده‌اند. این گروه از باکتری‌ها را شاید بتوان برای جذب زیستی فسفر و زیست‌بهسازی زیستگاهای آبی آلوده به فسفر بکار برد.

خان و همکاران (Khan *et al*., 2009) نشان دادند سودوموناس فلورسنس از منابع تری‌کلسیم فسفات، فسفات آلومینیوم و فسفات آهن به ترتیب ۱۰۰، ۹۲ و ۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر آزاد ساخت. توانایی حل فسفات ریزجانداران یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های افزایندگی رشد آن‌ها برای برآوردن نیاز فسفری گیاه به ویژه در خاک‌های با کمبود فسفر فراهم است (Winkler & Zotz, 2009; Giongo *et al*., 2013). گونه‌هایی از جنس سودوموناس، باسیلوس و ریزوبیوم توانمندترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات هستند (Brahmaprakash & Sahu, 2012). گیاهان به کمک ریزجانداران پیرامون ریشه خود می‌توانند از ریخت‌های دی‌کلسیم فسفات، تری‌کلسیم فسفات، اکتاکلسیم فسفات به خوبی بهره‌مند شوند (Safari Sinegani & Rashidi, 2011). یکی از دلایل حل فسفات، کاهش pH کشتگاه می‌باشد که این ناشی از تولید اسیدهای آلی به وسیله ریزجانداران بوده و حتی نوع کشتگاه و اکسیداسیون ماده قندی مورد استفاده نیز باعث تولید اسید و کاهش pH می‌شود. ریزجانداران به روش‌های گوناگونی همانند ساخت اسیدهای آلی، حل فسفات از منابع فسفات نامحلول و کلاته کردن می‌توانند به گیاه در برداشت فسفر از کانی‌های کم محلول و نافراهم کمک کنند. سنگ فسفات کانی بسیار نامحلول می‌باشد و آمیختن پودر آن با ریزجانداران حل‌کننده فسفات به حل آن کمک نموده و تا ۷۰ درصد کارکرد گیاهان را می‌تواند افزایش دهد (Verma, 1993).

آزمون کمّی توان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا

ریزجانداران کارایی ویژه‌ای در چرخه پتاسیم در زیستگاه‌های آبی و خاکی دارند. برخی از باکتری‌ها می‌توانند پتاسیم را در خاک به شکل محلول و فراهم دگرگون کنند. گروه بزرگی از باکتری‌های آزادکننده پتاسیم در خاک و ریزوسفر زندگی می‌کنند که پتاسیم کانی‌های خاک را با ساخت اسید به حالت محلول درآورده و برای گیاه فراهم می‌کنند (Luo *et al*., 2011; Diep & Hieu, 2013). اندازه آزادسازی پتاسیم به گونه سیلیکات‌های معدنی، ویژگی‌های زیستگاه و توان باکتری‌های آزادکننده پتاسیم بستگی دارد (Sugumaran & Janarthanam, 2007; Han & Lee, 2005). در این پژوهش در بررسی رهاسازی پتاسیم، تجزیه واریانس داده‌های اندازه‌گیری پتاسیم آزاد شده نشان داد که پیامد باکتری، کانی میکا و برهم‌کنش آن‌ها در پایه آماری یک درصد چشم‌گیر می‌باشد. پس از انجام آزمون میانگین به روش دانکن در سطح پنج درصد آشکار شد که آزادسازی پتاسیم از کانی بیوتیت بسیار (۱/۶۳ برابر) بیش‌تر از

موسکویت بوده است که برای آن‌ها به ترتیب ۱۱/۰۸ و ۶/۷۹ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. این یافته به سرشت کانی‌ها برمی‌گردد. ساختار کانی بیوتیت تری‌اکتاهدرال و در برابر آن کانی موسکویت دی‌اکتاهدرال است و این نشان می‌دهد که کانی بیوتیت ناپایدارتر و برای هوادیدگی زیستی آماده‌تر می‌باشد (Öborn *et al*., 2005). آزمون میانگین رهاشدن پتاسیم در برهم‌کنش باکتری و کانی میکا در جدول ۲ آمده است. بالاترین توان آزادسازی پتاسیم را جدایه 44SP-2 از میکای بیوتیت داشته (۱۶/۵۵ میلی گرم بر لیتر) و جدایه 35SP-2 بالاترین میانگین را از کانی موسکویت (۹/۹۳ میلی گرم بر لیتر) داشت. در این میان برخی از جدایه‌ها نه تنها در افزایش پتاسیم محلول کارایی نداشتند بلکه پتاسیم رها شده از واکنش‌های گوناگون در کشتگاه را نیز در ساختار زی‌توده خود جذب نموده و سبب کاهش پتاسیم محلول در کشتگاه در برابر نمونه شاهد شده‌اند، از این گونه‌ها می‌توان جدایه‌های 16SP-2، 35SP-2، 43SP-2 و 2SP-5 را یادآور شد که می‌توانند برای جذب زیستی پتاسیم گزینه‌های خوبی باشند. یافته‌های این بررسی نشان داد که از میان سه جنس ازتوباکتر، سودوموناس و بیجرینکیا بیش‌ترین آزادکنندگی پتاسیم را جنس سودوموناس و ازتوباکتر دارد (جدایه44SP-2، 35SP-2). همانند این یافته‌ها هو و بویر (Hu & Boyer, 1996) نیز گزارش کرده‌اند که گونه‌های سودوموناس توانایی بالایی در آزادسازی پتاسیم از میکا دارند. توانایی باکتری‌ها در آزادسازی پتاسیم تا اندازه فراوانی به گونه و سرشت کانی‌های پتاسیم وابسته است (Zeng *et al*., 2012). میشوستین و همکاران (Mishustin *et al*., 1981) نیز توانستند برای دو هفته از انکوباسیون باکتری ازتوباکتر کروکوکوم، نزدیک هفت درصد پتاسیم آزاد شده از کانی ارتوکلاز به‌دست آورند.

آزمون کمّی توان ساخت اکسین

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که ساخت اکسین وابسته به کاربرد تریپتوفان در کشتگاه نبوده است ولی وابسته به جدایه‌های باکتریایی و برهم‌کنش این دو می‌باشد. این آزمایش نشان داد که بهره‌گیری از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان نتوانست ساخت اکسین جدایه‌های باکتریایی را در کشتگاه LG دگرگون کند. آزمون میانگین اکسین ساخته شده در برهم‌کنش جدایه و کاربرد تریپتوفان در جدول ۲ آورده شده است. جدایه 34SPIII با میانگین ۱۰/۶۵ و ۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین توان ساخت اکسین را در حضور و عدم حضور تریپتوفان در کشتگاه LG داشت (جدول ۲). حضور تریپتوفان در کشتگاه پیامد افزایشی چشم‌گیری بر ساخت اکسین به‌وسیله جدایه 34SPIII داشت هر چند برخی از جدایه‌ها (14SPI، 16SP-2، 35SP-2 و 43SP-2) در نبود تریپتوفان اکسین بیش‌تری را ساختند (جدول ۲). برخی از ریزجانداران از تریپتوفان همانند پیش‌ماده برای سنتز ایندول استیک اسید بهره‌گیری می‌کنند. راه‌های گوناگونی برای ساخت ایندول استیک اسید گزارش شده است که هر یک از آن‌ها با ساخت تریپتوفول، تریپتامین، ایندول ۳-پیروویک اسید و ایندول ۳-اسیدآمید آغاز می‌شوند (Gravel *et al*., 2007). بنابراین برخی از جدایه‌های آزمون شده شاید از تریپتوفان همانند پیش‌ماده برای ساخت اکسین بهره‌گیری نکرده‌اند و روش‌های دیگری داشته‌اند که در بودن آن در زیستگاه اندازه کم‌تری اکسین ساخته‌اند.

احمد و همکاران (Ahmad *et al*., 2008) جدایه‌های باکتری جنس‌های ازتوباکتر، سودوموناس، مزوریزوبیوم و باسیلوس را از دیدگاه ساخت اکسین ارزیابی کردند و دیدند که ۸۰ درصد جدایه‌های ازتوباکتر، سودوموناس و مزوریزوبیوم توانایی ساخت ایندول استیک اسید را داشتند. در برابر آن‌ها تنها ۲۰ درصد باسیلوس‌ها توانستند ایندول استیک اسید بسازند. در همه غلظت‌های تریپتوفان (۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بالاترین اندازه ایندول استیک اسید در کشت سودوموناس و به دنبال آن در کشت ازتوباکتر و باسیلوس ساخته شد. توانایی ساخت ایندول استیک اسید در گونه‌های گوناگون سودوموناس را بسیاری از پژوهش‌گران گزارش کرده‌اند (Jasim *et al*., 2014; Noreen *et al*., 2012). توانایی ساخت ایندول استیک اسید در حضور یک پیش‌ماده همانند تریپتوفان برای چندین جدایه افزآینده رشد گیاه از جنس آزوسپیریلوم، ازتوباکتر، باسیلوس، بورخولدریا، انتروباکتر و سودوموناس‌ها گزارش شده است. تراوش‌های ریشه گیاهان گوناگون دارای تریپتوفان بوده که می‌تواند همانند پیش‌ماده برای سنتز ایندول استیک اسید در

ریزجانداران ریزوسفری بهره‌گیری شده (Dastager *et al*., 2010) و باعث افزایش رشد گیاه شوند.

آزمون کیفی ساخت سایدروفور

ساخت سایدروفور جدایه‌ها با بهره‌گیری از CAS بررسی شد. از میان جدایه‌ها، جدایه 14SPI، 16SP-2، 44SP-2، 43SP-2، 14SP2-1، 34SPIII توانایی ساخت هاله نارنجی داشتند. بنابراین ۶۶ درصد جدایه‌ها توانایی ساخت هاله نارنجی را داشتند (جدول ۲). پیدایش هاله نارنجی در پیرامون کلنی‌ها وابسته به کلاته کردن آهن می‌باشد که نشانی از ساخت سایدروفور در زیستگاه دارد. جدا شدن آهن از کمپلکس CAS باعث تغییر رنگ کشتگاه از آبی به نارنجی می‌شود (Schwyn *et al*., 1987). باسیلوس‌های گوناگون دارای توانایی ساخت سایدروفور هستند (Wilson *et al*., 2010). هم‌چنین در بسیاری از پژوهش‌ها توانایی ساخت سایدروفور در باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه سودوموناس‌ها گزارش شده است (Jasim *et al*., 2014). میلاجرس و همکاران (Milagers *et al*., 1999) بیان داشتند که در محیط کشت CAS سایدروفورهای منوهیدروکسامات و تری هیدروکسامات به‌ترتیب رنگ، نارنجی مایل به قرمز و نارنجی ایجاد می‌کنند. در حالی که کمپلکس‌های کاتکولی موجب تغییر رنگ محیط کشت آبی به ارغوانی تا قرمز مایل به ارغوانی می‌شوند. با توجه به این موضوع می‌توان بیان داشت که نوع سایدروفورهای ساخته شده به وسیله ازتوباکتر کروکوکوم از نوع هیدروکساماتی می‌باشند.

پراکنش ازتوباکترها در نمونه خاک‌های بررسی شده

گرچه شمار جدایه‌های نخستین به‌دست آمده از نمونه خاک‌های سه استان آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان (با دو اقلیم نیمه‌خشک و مرطوب) با کاربری‌های گوناگون به ۵۰ جدایه می‌رسید، اما برخی از باکتری‌های همانندبه ازتوباکتر در این پژوهش بر اساس همانندی ویژگی‌های فنوتیپی و ریختی کنار گذاشته شده و شناسایی نه جدایه مانده نیز نشان داد که تنها پنج جدایه از جنس ازتوباکتر بوده که همگی آن‌ها از یک گونه به نام ازتوباکتر کروکوکوم می‌باشند. با توجه به ویژگی‌های خاک ارائه شده در جدول ۳، بیش‌ترین حضور ازتوباکتر کروکوکوم در استان آذربایجان شرقی با اقلیمی نیمه‌خشک و در خاک‌هایی با کاربری چراگاه، مرتع و لوبیا مشاهده شد. نبود ازتوباکتر در نمونه خاک‌های برداشت شده با اقلیم همانند (استان اردبیل) شاید به‌دلیل کنارگذاری آن‌ها باشد. به‌گونه‌ای که جدایه‌های به‌دست آمده از این استان همانند بوده و کنار گذاشته شده‌اند. جدا شدن ازتوباکتر از خاک‌های با pH های خنثی و آهکی با بافت سبک (جدول ۳) مورد توجه می‌باشد. فراوانی ازتوباکتر در خاک وابسته به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی (ماده آلی خاک، pH، دما، عمق نمونه‌برداری از خاک و رطوبت آن) و ویژگی‌های زیستی و برهم‌کنش‌های آن‌ها می‌باشد (Kizilkaya, 2009)، هم‌چنین شیوه کاربری و مدیریت زمین نیز افزون بر تغییر ویژگی‌های زیستی و شیمیایی خاک بر پراکنش و فراوانی ریزجاندارن پیامددار است. در این پژوهش از برنجزارهای استان گیلان هم ازتوباکتر کرکوکوم جدا شد. این باکتری (44SP-2) از دیدگاه توانایی‌های بررسی شده در برابر ازتوباکترهای جداشده از خاک‌های استان آذربایجان شرقی دارای ویژگی‌های هم‌ارزی همانند جدایه 14SP2-1 بود و از نظر توان تثبیت نیتروژن، آزادسازی پتاسیم و حل فسفر، جزء برترین جدایه‌های ازتوباکتر جداسازی شده در این پژوهش بودند (جدول ۲). اکنون روشن شده است که فراوانی ازتوباکتر کروکوکوم در خاک به اسیدیته و حاصل‌خیزی خاک وابسته بوده و به‌گونه‌ای که در خاک‌های با pH خنثی یا کمی قلیایی، بیش‌تر بوده و در خاک‌های اسیدی فراوانی چندانی ندارند (Lenart, 2012). این گونه از باکتری‌ها در خاک‌های کشاورزی مناطق معتدل فراوان‌تر می‌باشند. از ویژگی‌های این گونه ساخت رنگ‌دانه قهوه‌ای-سیاه نامحلول در آب است (Kizilkaya, 2009). بررسی توان بیجرینکیای جدا شده از خاک‌های استان آذربایجان شرقی (2SP-5) در برابر بیجرینکیای جدا شده از خاک‌های شالیزار گیلان (43SP-2) نشان داد که این جدایه توان آزادسازی پتاسیم و تولید اکسین بیش‌تری دارد. هر چند توان تولید سایدروفور در آن دیده نشد (جدول ۲). در این پژوهش بررسی آزمون همه جدایه‌ها (۵۰ جدایه جداسازی شده از سه استان) امکان‌پذیر نبوده و ضرورت مطالعات بیشتر بر روی آنها احساس می‌شود.

جدول ۳- ویژگی‌های اقلیمی، کاربری و خاک‌های برداشت شده و ازتوباکترهای جدا شده از آن‌ها

Table 3. The climate, land-use and soil properties of the samples used in this study for *Azotobacter* isolation

Soil texture	%CCE	%O.C	EC	PH	Usage	Climate	Province	Identified bacteria	Soil No.
	Soil properties								
Sandy clay	17.43	1.61	4.66	7.36	Pasture	Semi-arid	East Azerbaijan	*A. chroococcum* 14SPI	14
Sandy clay	17.43	1.61	4.66	7.36	Pasture	Semi-arid	East Azerbaijan	*A. chroococcum* 14SP2-1	14
Sandy loam	10.97	1.66	1.82	7.81	Corn	Semi-arid	East Azerbaijan	*A. chroococcum* 16SP-2	16
Clay loam	5.44	0.68	1.66	7.21	Bean	Semi-arid	East Azerbaijan	*A. chroococcum* 35SP	35
Clay	4.88	2.98	1.62	6.64	Rice	Humid	Gilan	*A. chroococcum* 44SP-2	44
Sandy clay loam	10.71	0.94	2.41	7.52	Alfaalfa	Semi-arid	East Azerbaijan	*Beijerinckia sp.* 2SP-5	2
Clay loam	4.92	3.69	1.13	6.94	Rice	Humid	Gilan	*Beijerinckia sp.* 43SP-2	43
Clay	6.51	2.11	0.97	7.57	Alfaalfa	Semi-arid	East Azerbaijan	*Pseudomonas sp.* 34SPIII	34
Clay loam	5.44	0.68	1.66	7.21	Bean	Semi-arid	East Azerbaijan	*Pseudomonas sp.* 35SP-2	35

CCE کربنات کلسیم معادل، OC کربن آلی، EC هدایت الکتریکی

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش ۵۰ جدایه باکتری به‌دست آمد که همه جدایه‌ها، گرم منفی و کاتالاز مثبت بودند. ولی همگی آن‌ها توانایی ساخت رنگ‌دانه و کیست را نداشتند. خالص‌سازی باکتری‌ها در دو کشتگاه بدون نیتروژن LG و کشتگاه عمومی مانند Nutrient Agar انجام شد تا ریخت کیست و ریخت رویشی هر دو قابل مشاهده باشد. ریخت پرگنه و چگونگی رشد یک جدایه در هر دو کشتگاه، مبنای گزینش آن شد. پرگنه لعابی، ساخت رنگ‌دانه و مشاهده کیست در این گام بررسی شد. برمبنای این ویژگی‌ها و هم‌چنین بررسی فنوتیپ و ریخت‌شناسی و چگونگی رشد آن‌ها در کشتگاه LG و NA از میان ۵۰ جدایه تنها نه جدایه برای شناسایی و بررسی ویژگی‌های افزآیندگی رشد گیاه انتخاب شد. شناسایی‌ها نشان داد که جنس‌های سودوموناس و بیجرینکیا نیز در بخش نخست آزمایش جداسازی شده‌اند و این نشان‌دهنده آن است که روش‌های پیشنهاد شده برای جداسازی ازتوباکترها کاملاً روشی ویژه برای ازتوباکتر نبوده که با این روش، باکتری‌های دیگر نیز از جنس‌های نزدیک جداسازی خواهند شد. بنابر یافته‌های این پژوهش می‌توان گفت که ازتوباکترهای به‌دست آمده از خاک‌ها با روش بکاررفته همگی از گونه ازتوباکتر کروکوکوم بوده‌اند که از خاک‌های دو استان آذربایجان شرقی و گیلان با کاربری چراگاه، مرتع و شالیزار بوده که حاکی از فراوانی بیش‌تر این گونه در خاک‌های بررسی شده می‌باشد. در این پژوهش ازتوباکتری ناهمانند با دیگر باکتری‌های آزمون شده، از استان اردبیل به‌دست نیامد که دلیل آن همانندی آن‌ها با گونه‌های آذربایجان شرقی بوده که در گام جداسازی کنار گذاشته شده‌اند. ازتوباکترهای جدا شده از خاک‌های استان آذربایجان شرقی در برابر آن‌چه از شالیزارهای گیلان جدا شده بود ناهمانندی بیش‌تری در ویژگی‌های بررسی شده داشتند، اما دو جدایه برتر از این دو استان در بیش‌تر ویژگی‌های بررسی شده هم‌تراز بودند و با هم ناهمانندی چشم‌گیری از نظر آماری نداشتند. از سوی دیگر بیجرینکیای جدا شده از آذربایجان شرقی توانایی بیش‌تری در آزادسازی پتاسیم و ساخت اکسین در برابر جدایه به‌دست آمده از شالیزار داشت. از این رو، شناخت گوناگونی زیستی و اکولوژی ازتوباکترهای خاک‌های این سه استان نیاز به بررسی ویژه و بیش‌تری دارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران جوان، همچنین از کمک و همکاری دانشگاه بوعلی سینا همدان و دانشگاه تبریز در اجرای این تحقیق نهایت امتنان را دارند.

Reference

Ahmad F., Ahmad I. and Khan M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2): 173-181.

Altschul SF., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 389-402.

Aquilantia L., Favillib F. and Clementia 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 S.A.R. and Ghorbani Nasrabadi R. 2016. Evaluation of plant growth promotion chracteristics of native soil *Azotobacter* isolates from Golestan province. *Jouranl of Soil Management and Sustainable Production*, 6(1): 233-246. (In Persian)

Brahmaprakash G. P. and Sahu P. K. 2012. Biofertilizers for sustainability. *Journal of the Indian Institute of Science*, 92(1): 37-62.

Cotteni A. 1980. Methods of Plant Analysis. *In*: Soil and Plant Testing FAO Soils Bulletin. 38/2, pp. 64-100.

Dastager S. G., Deepa C. K. and Pandey A. 2010. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 987-992.

Deaker R., Laszlo Kecskes M. Timothy Rose M. Amprayn K. Krishnen G. Thi Kim Cuc T. Thuy Nga V. Thi Cong P. Thanh Hien N. and Robert Kennedy I. 2011. Practical Methods for the Quality Control of Inoculant Biofertilizers. ACIAR. 101p.

Diep C. N. and Hieu T. N. 2013. Phosphate and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of denatured rock mountain, Ha Tien, Kien Giang province Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 1(3): 88-92.

Fageria N. K., Baligar V. C. and Li Y. C. 2009. Differential soil acidity tolerance of tropical legume cover crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(7-8): 1148-1160.

Farajzadeh D., Yakhchali B., Aliasgharzad N., Sokhandan-Bashir N. and Farajzadeh M. 2012. Plant growth promoting characterization of indigenous Azotobacteria isolated from soils in Iran. *Current Microbiology*, 64(4): 397-403.

Gee G.W. and Bauder J.W. 1986. Particle Size Analysis. *In*: Methods of Soil Analysis. Part 1, Physical and Mineralogical Methods. American Society Agronomy Publication. 383-411.

Giongo A., Beneduzi A., Gano K., Vargas L. K., Utz L. and Passaglia L. M. P. 2013. Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea* Gaud. and *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) LB Smith (Bromeliaceae). *Biota Neotropica*, 13(3): 80-85.

Gravel V., Antoun H. and Tweddell R. J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8): 1968-1977.

Han H. S. and Lee K. D. 2005. Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability and growth of eggplant. *Research journal of agriculture and biological sciences*, 1: 176-180.

Harris J.O. 1973. *Azotobacter* of the Konza Prairie. In L.C. Hulbert (Eds): Third Midwest Prairie Conference Proceedings. Manhattan, KS: Division of Biology, Kansas State University, pp. 53-54.

Hu X. and Boyer G. L. 1996. Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4044-4048.

Jasim B., Joseph A. A., John C. J., Mathew J. and Radhakrishnan E. K. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *Biotechnology*, 4(2): 197-204.

Jiménez D. J., Montaña J. S. and Martínez M. M. 2011. Characterization of free nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3): 846-858.

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.

Kennedy C., Rudnick P., MacDonald M. and Melton T. 2005. "Genus III: *Azotobacter*,"*In*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part B, the Gammaproteobacteria, G. M. Garrity, Ed.,vol.2, pp.384-402, *Springer*, NewYork, NY, USA, 2nd edition.

Khan A.A., Jilani G., Akhtar M.S., SaqlanNaqvi S.M. and Rasheed M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production, *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1(1): 48-58.

Khosravi H. 2013. Application of biofertilizers containing free-living nitrogen-fixing microorganisms in agriculture. *Journal Management System*, 2(1): 51-63. (In Persian)

Khosravi H. 2013. *Azotobacter* and its role in the management of soil fertility. *Journal Management System*, 2(2): 79-94. (In Persian)

Kizilkaya R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering*, 33(2): 150-156.

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 soil. *Journal of Environmental Biology*, 30(1): 73-82.

Lenart A. 2012. Occurrence, characteristic and genetic diversity of *Azotobacter chroococcum* in various soils of southern Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(2): 415-424.

Luo H., Chang R., Wang S., Xu J., Zhou X. and Zhang J. 2011. Screening of highly effective potassium bacteria in rhizosphere soil of high- end brand tobacco in Yunnan, South-west china. *Journal of Agricultural Science*, 24: 1816-1817.

Milagres A. M., Machuca A. and Napoleao D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1): 1-6.

Mishustin E.N., Smirnova G.A. and Lokhmachea R.A. 1981. The decomposition of silicates by microorganisms and the use of silicate bacteria fertilizer. *Biologic Bull Academic Science*, 8: 400-409.

Motsara M. R. and Roy R. N. 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis (Vol. 19). Rome: FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin, 205p.

Noreen S., Ali B. and Hasnain S. 2012. Growth promotion of *Vigna mungo* (L.) by *Pseudomonas spp*. exhibiting auxin production and ACC-deaminase activity. *Annals of Microbiology*, 62(1): 411-417.

Öborn I., Andrist Rangel Y., Askekaard M., Grant C. A., Watson C. A. and Edwards A. C. 2005. Critical aspects of potassium management in agricultural systems. *Soil Use and Management*, 21(1): 102-112.

Rajaie S., Raiesi F., Alikhani, H. and Givi J. 2005. Potential use of native *Azotobacter Chroococcum* strains as a plant growth promoting biofertilizer (PGPB) in some wheat fields of Chaharmahal va Bakhtiari Province. MSc Thesis, University of Shahrekord, 144p.

Rodríguez H. and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4): 319-339.

Rubio E. J., Montecchia M. S., Tosi M., Cassán F. D., Perticari A. and Correa O. S. 2013. Genotypic Characterization of Azotobacteria Isolated from Argentinean Soils and Plant-Growth-Promoting Traits of Selected Strains with Prospects for Biofertilizer Production. *The Scientific World Journal*, 10: 1-12.

Safari Sinegani A. A. and Rashidi T. 2011. Changes in phosphorus fractions in the rhizosphere of some crop species under glasshouse conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(6): 899-907.

Safari Sinegani A.A., Sharifi Z. and Safari Sinegani M. 2010. Methods in Applied Microbiology. Bu- Alisina University Press. Iran, 457p. (In Persian)

Sarikhani M.R., Khoshru B. and Oustan Sh. 2016. Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under *in vitro* conditions. *Geomicrobiology Journal*, 33: 832-838.

Schwyn B. and Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47-56.

Seeley H.W. and Vandemark P.J. 1970. Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology. D. P. Tarapo Revale Sons and Company Ltd., Bombay, 383p.

Sperber J. I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Crop and Pasture Science*, 9(6): 778-781.

Steenhoudt O. and Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4): 487-506.

Sugumaran P. and Janarthanam B. 2007. Solubilization of potassium-containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. *World Journal of Agricultural Science*, 3: 350-355.

Tejera N., Lluch C., Martinez-Toledo M. V. and Gonzalez-Lopez J. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and soil*, 270(1): 223-232.

Verma L.N. 1993. Biofertiliser in Agriculture. *In*: Thampan P.K. Organics in Soil Health and Crop Production. Peekay Tree Crops Development Foundation, Cochin, India, pp. 152-183.

Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.

Whitelaw M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69: 99-151.

Wilson M. K., Abergel R. J., Arceneaux J. E., Raymond K. N. and Byers B. R. 2010. Temporal production of the two *Bacillus anthracis* siderophores, petrobactin and bacillibactin. *Biometals*, 23(1): 129-134.

Winkler U. and Zotz G. 2009. Highly efficient uptake of phosphorus in epiphytic bromeliads. *Annals of botany*, 103(3): 477-484.

Zeng X., Liu X., Tang J., Hu S., Jiang P., Li W. and Xu L. 2012. Characterization and potassium-solubilizing ability of *Bacillus circulans* Z 1–3. *Advanced Science Letters*, 10(1): 173-176.

Isolation, Identification, and Determination of Plant Growth Promoting Properties of Azotobacteria Isolated from Soil Samples North-West of Iran under Different Land Use

Mitra Ebrahimi[1*], Ali Akbar Safari Sinegani[1], Mohammad Reza Sarikhani[2], Seyed Abolghasem Mohammadi[3], Nasser Aliasgharzad[2]

(Received: December 2016 Accepted: April 2017)

Abstract

Azotobacter is free-living nitrogen-fixing bacteria that it leading to promoting plants growth through various ways. Frequency and distribution of *Azotobacter* is affected by soil use and its properties. Accordingly, this study aimed to isolate and identify some of plant growth promoting (PGP) Azotobacters. To this end, 50 soil samples were taken randomly from depth 0-25-cm under different land-uses in three provinces viz. Eastern-Azerbaijan, Ardabil and Gilan. Soil paste method was used for isolation of these bacteria and purification was done in LG and NA media. We first isolated 50 bacterial isolates based on the phenotypic and morphological properties. And then we selected nine isolates of them for detailed and deep studies (including 2SP-5, 14SPI, 14SP2-1, 16SP-2, 34SPIII, 35SP, 35SP-2, 43SP-2 and 44SP-2). Results of molecular identification of bacteria (16S rDNA) revealed that among nine isolates, the five isolates (viz. 14SPI, 14SP2-1, 16SP-2, 35SP and 44SP-2) belonged to *Azotobacter chroococcum*, and isolates 34SPIII and 35SP-2 belonged to *Pseudomonas* sp. while 2SP-5 and 43SP-2 were identified as *Beijerinckia* sp. We also found the highest N fixation, and P solubility and auxin production were recorded by *A. chroococcum* 14SP2-1 and *Pseudomonas* sp. 34SPIII, respectively. Maximum potassium releasing was observed by *A. chroococcum* 14SP2-1 and 44SP-2. In this study, all the identified Azotobacteria belonged to *A. chroococcum* which isolated from the pasture, corn and rice lands of East Azerbaijan and Gilan provinces.

Key words: Molecular identification of bacteria, N-fixing bacteria, Plant growth promoting properties, Soil paste

1. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran
* Corresponding Author Email: mtrr_ebrahimi@yahoo.com