نشریه علمی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد شانزدهم، شماره ۳(۶۳)، پاییز ۱۴۰۱، صفحه ۴۱۰-۳۹۱

مقاله پژوهشی DOI: 10.30495/JCEP.2022.1911464.1719

جداسازی ازتوباکترهای بومی از خاک مناطق مختلف تهران و بررسی اثر تلقیح آنها بر رشد گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.)

شقایق گلچین‌ایرانی[۱]، غلامرضا طاهری‌سنگسری[۲*]، اکرم‌سادات طباطبایی بفرویی[۳] و محمدجواد اوستا[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۳۱

چکیده

ازتوباکتر، باکتری هوازی، گرم منفی، شیمیوارگانوتروف است که قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی به صورت غیرهمزیست می‌باشد. نقش ازتوباکتر در رشد گیاه به‌واسطه تولید هورمون‌های محرک رشد، توان حل کنندگی فسفات‌های نامحلول، تثبیت نیتروژن، افزایش تحمل به تنش‌ها و بیوکنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشد. این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی ازتوباکتر بومی تثبیت‌کننده نیتروژن از خاک مناطق مختلف شهر تهران صورت گرفت. همچنین، تاثیر تلقیح جدایه‌ها بر تقویت رشد گیاه گوجه‌فرنگی نیز بررسی و در نهایت شرایط رشد جدایه برتر بهینه‌سازی شد. در این پژوهش، از شش منطقه تهران نمونه‌برداری انجام و جدایه‌های ازتوباکتر با استفاده از روش تهیه رقت متوالی از نمونه‌های خاک، جداسازی و با کمک تست‌های بیوشیمیایی متداول تعیین هویت شدند. سپس، ژن *nif* H، کد کننده آنزیم نیتروژناز، در جدایه‌ها با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز ریل تایم شناسایی و سپس بذرهای گوجه فرنگی با ایزوله‌ها تلقیح و میزان رشد گیاهچه، شامل طول ساقه و ریشه در طی ۳۴ روز سنجیده شدند. پارامترهای دما، pH، میزان هوادهی، منبع کربن و نیتروژن برای جدایه برتر بهینه‌سازی شدند. در این مطالعه ۲۷ جدایه ازتوباکتر تثبیت‌کننده نیتروژن به‌دست آمد. تمامی جدایه‌ها افزایش بارزی ($p < ۰/۰۵$) در طول ساقه و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی نسبت به سویه استاندارد و کنترل منفی ایجاد کردند. جدایه شماره ۲۱ بیشترین تاثیر را بر رشد گیاه نشان داد و بهترین شرایط رشد آن، در حضور منبع کربن مانیتول، منبع نیتروژن پپتون، دور گردشی ۲۰۰rpm، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH= ۷ به‌دست آمد. با توجه به نتایج این مطالعه، جدایه‌های بومی به‌دست آمده به‌ویژه جدایه شماره ۲۱ پس از بررسی‌های بیشتر دارای قابلیت استفاده به‌عنوان کود بیولوژیکی هستند.

واژگان کلیدی: ازتوباکتر، بهینه‌سازی، جداسازی، کود بیولوژیک، گیاه گوجه‌فرنگی، *nif* H.

۱- دانش‌آموخته گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲ - عضو هیات علمی گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استادیار گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴- عضو شرکت دانش بنیان رویان تیسان سبز، تهران، ایران.

(نگارنده‌ی مسئول) 1978ghts@gmail.com

مقدمه

یکی از ارکان اصلی در کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای زیستی با هدف حذف یا کاهش مصرف کودهای شیمیایی است. کودهای زیستی به‌صورت مایهٔ تلقیح میکروبی و به‌عنوان یک ترکیب حامل سوش‌های میکروبی مؤثر و با راندمان بالا برای تأمین یک یا چند عنصر غذایی مورد نیاز تعریف می‌شوند (El-Zeiny, 2007). فواید کودهای بیولوژیک عبارتند از: هزینه تولید کم، عدم ایجاد آلودگی در اکوسیستم، جبران کمبود عناصر در خاک، کاهش مصرف کودهای شیمیایی و عدم خطر برای انسان و سایر موجودات زنده می‌باشد. کود زیستی به‌مواد حاصلخیز کننده‌ای اطلاق می‌شود که دارای تعداد کافی از یک یا چند گونه از ارگانیسم‌های مفید خاکزی هستند. در واقع این کودها ارگانیسم‌هایی هستند که قادرند طی یک پروسه بیولوژیک، عناصر غذایی را از شکل غیرقابل استفاده به شکل قابل استفاده برای گیاه تبدیل کنند (Aseri *et al.*, 2008). محققان به این نتیجه رسیدند که کشت گیاهان با کودهای بیولوژیک می‌تواند باعث مقاومت بالاتر گیاهان به بیماری‌ها و تولید هورمون‌های گیاهی و ویتامین‌های محلول در آب شود. علاوه بر این، میکروارگانیسم‌ها می‌توانند رشد گیاه را افزایش دهند (Kumar *et al.*, 2008).

کودهای شیمیایی نیتروژنی باعث آلودگی نیتراتی آب‌های سطحی و زیرزمینی و در نهایت موجب مسمومیت انسان، دام و آبزیان می‌شوند. همچنین، مشکل افزایش دنیتریفیکاسیون در نتیجه سنتز بیشتر گازهای سمی و تخریب لایه حیاتی ازن را به همراه دارند (Martin *et al.*, 2011). محققان بر این باور هستند که استفاده از کودهای شیمیایی ممکن است مانع جذب عناصر کم مصرف، در نتیجه باعث ایجاد یک عدم تعادل در گیاهان شوند (Das *et al.*, 2008). ظهور این قبیل اثرات مخرب و بسیاری مسایل دیگر ضرورت تجدید نظر در روش‌های تولید محصولات و لزوم فراهم‌سازی شرایط برای استفاده بیشتر از فرایندهای مفید طبیعی مانند تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را ایجاد می‌کند. تأمین عناصر غذایی به صورت کاملاً متناسب با تغذیه طبیعی گیاهان، کمک به تنوع زیستی، تشدید فعالیت‌های حیاتی، بهبود کیفیت و حفظ بهداشت محیط زیست و در مجموع، حفظ و حمایت از سرمایه‌های ملی (آب، خاک و منابع انرژی غیرقابل تجدید) از مهم‌ترین دلایل ضرورت استفاده از کودهای زیستی محسوب می‌شود (Nosheen *et al.*, 2016).

از جمله یون‌های ضروری برای ادامه حیات گیاه، می‌توان به نیتروژن اشاره کرد. بر اساس وزن خشک، یون نیتروژن چهارمین عنصر اصلی تشکیل دهنده‌ی گیاهان محسوب می‌شود. به دلیل اینکه مقدار نیتروژن خاک محدود است گیاهان باید با انواع میکروارگانیسم‌های خاک بر سر این منبع محدود رقابت کنند. در نتیجه، نیتروژن اغلب یکی از عناصر غذایی است که گیاهان چه در اکوسیستم‌های طبیعی و چه در اکوسیستم‌های کشاورزی با کمبود آن مواجه می‌شوند. شناخت ریزجانداران مفید خاکزی و روابط متقابل آنها با سایر ریزموجودات، گیاه و خاک از مباحث اصلی علم میکروبیولوژی خاک است. فرایند تجزیه مواد آلی، نیترات‌زدایی، تولید نیترات، آمونیاک‌سازی، تثبیت نیتروژن مولکولی، گردش عناصر به‌ویژه کربن، نیتروژن، فسفر و گوگرد توسط ریزجانداران خاک انجام می‌شود. توانایی باکتری‌های موجود در کودهای زیستی، در تولید انواع مواد محرک رشد مانند سیدروفورها،

مواد هورمونی مانند گروه اکسین‌ها و جیبرلین‌ها، آزادسازی عناصر مغذی گیاه مانند فسفر و پتاسیم از ترکیبات نامحلول آنها در خاک، تجزیه ترکیبات آلی پیچیده در خاک و کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی می‌باشد که نهایتاً منجر به تحریک بیشتر رشد گیاه و افزایش کمی و کیفی محصول می‌شوند (Ardakani *et al.*, 2001).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که ازتوباکتر کروکوکوم باکتری آزادزی و تثبیت‌کننده نیتروژن است و باعث رشد گیاه و تحریک باکتری‌های محرک رشد (PGPR) برای تولید هورمون‌های گیاهی می‌شود و همچنین منجر به تولید سیدروفورها نیز می‌گردد که پاتوژن‌های گیاهی را سرکوب و آهن را از دسترس آنها خارج می‌کند (Romero-Perdomo *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2001). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که جنس ازتوباکتر، علاوه بر اینکه یک باکتری خاک‌زاد، آزادزی و تثبیت کننده نیتروژن است، می‌تواند با استفاده از آنزیم فسفاتاز قلیایی و سنتز ATPase، تحت شرایط رشد، باعث انحلال سنگ فسفات در مناطق مستعد خشک‌سالی شود (Chavada *et al.*, 2010). در طی تحقیقی در کشور هند نشان داده شد که جنس ازتوباکتر می‌تواند، هم در پرورش ماهی و هم در تولید ورمی‌کمپوست با توجه به توانایی خود در تثبیت نیتروژن و حل فسفات مفید بوده و به کار گرفته شود (Kumar and Singh, 2001).

تلقیح گیاه با ازتوباکتر علاوه بر کاهش مصرف کود نیتروژنی در حد ۳۰ تا ۳۵ درصد، دارای اثرات مفید دیگری است که در مقایسه با مقدار مشابه کود نیتروژنی شیمیایی، می‌تواند سبب رشد بهتر گیاه و افزایش مقدار محصول آن گردد. این تأثیر مفید را بیشتر به تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند اکسین‌ها نسبت داده‌اند. بررسی بوم شناختی جنس و گونه ازتوباکتر کروکوکوم آشکار کرد که رشد اندام هوایی و ریشه گیاهان مرتعی به‌ترتیب از تیمار کود نیتروژنه به سمت تیمار تلقیح با ازتوباکتر و تیمار توأم نسبت به شاهد افزایش یافته است (Hajeeboland *et al.*, 2004). تأثیر تلقیح ازتوباکتر به‌ویژه همراه با کود دامی آلی بر روی عملکرد محصولاتی مانند ذرت و ارزن مثبت بوده است (Martin *et al.*, 2011). به‌علاوه، تسریع در جوانه‌زنی بذر در اثر تلقیح با ازتوباکتر نیز گزارش شده است، این موضوع در حقیقت تا حدی مربوط به توانایی ازتوباکتر برای تهیه مواد رشدی و تولید آنتی‌بیوتیک ضد قارچ است (Dupin *et al.*, 2020). برخی محققان ایرانی اظهار داشتند که با استفاده از کودهای زیستی ازتوباکتر و آزوسپریلیوم می‌توان مصرف کود شیمیایی را از ۱۵۰ به ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کاهش و عملکردی مشابه با کودهای شیمیایی تولید کرد (Yasari *et al.*, 2009). به طوری‌که، اثر تلقیح ازتوباکتر در ترکیب با کود دامی را بر رشد گندم دیم معنی‌دار گزارش نمودند (Khosravi and Mahmoudi, 2013).

از آن‌جایی که تاکنون در داخل کشور هیچ گونه مطالعه‌ای بر روی جداسازی ایزوله‌های بومی ازتوباکتر و نیز بهینه‌سازی شرایط رشد آنها صورت نگرفته است، در این پژوهش اقدام به جداسازی، غربالگری و شناسایی سویه‌های بومی ازتوباکتر از خاک مناطق مختلف تهران شد و بررسی تأثیر تلقیح آنها بر رشد گیاه گوجه‌فرنگی نیز از اهداف دیگر این تحقیق بود. همچنین بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه برتر، جهت استفاده در کودهای زیستی انجام و مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در شرکت رویان تیسان سبز مستقر در مرکز رشد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری در سال ۱۳۹۷ انجام شد. سویه‌های استاندارد ازتوباکتر کروکوکوم IBRC-M 10787[1] و ازتوباکتر وینلاندی IBRC-M 10786[2] از مرکز ذخایر ژنتیک ایران و سویه استاندارد ازتوباکتر PTCC 1658 از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شدند.

جداسازی و شناسایی مقدماتی ازتوباکتر

نمونه‌برداری از خاک‌های پارک جنگلی چیتگر، پارک جنگلی پردیسان، بوستان نهج‌البلاغه، بوستان جمشیدیه، بوستان ملت و مزرعه گندمی در حومه شهر تهران، از عمق ۳ تا ۱۰ سانتی‌متری سطح خاک و نزدیک به ریشه گیاهان تحت شرایط استریل انجام و با ثبت مشخصات در دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شدند. از نمونه‌های تهیه شده به روش کخ رقت تهیه شد و از رقت‌های تهیه شده بر روی محیط کشت اختصاصی ازتوباکتر، محیط کشت اشبی[3] محتوی ۲۰ گرم مانیتول، ۰/۲ گرم دی‌پتاسیم فسفات، ۰/۲ گرم منیزیم سولفات، ۰/۲ گرم کلرید سدیم، ۰/۱ گرم پتاسیم سولفات و ۵ گرم کلسیم کربنات، کشت باکتریایی تهیه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. از کلنی‌های به‌وجود آمده جهت تهیه کشت خالص ازتوباکتر، بررسی مورفولوژیکی صورت گرفت و کلنی‌های شبیه به ازتوباکتر به روش کشت چهار مرحله‌ای بر روی محیط‌های کشت مجزا، کشت داده شدند. برای جداسازی اختصاصی جدایه‌های ازتوباکتر، تک کلنی‌های تشکیل شده از نظر خصوصیات ماکروسکوپی (رنگ، قوام، شکل ظاهری کلنی و سایز)، میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم) و بیوشیمیایی (آزمون استفاده از سیترات، تولید آنزیم کاتالاز و اوره‌آز، آزمون حرکت و تخمیر قندهای مختلف از جمله گلوکز، مالتوز و فروکتوز) مورد بررسی قرار گرفتند.

شناسایی پیشرفته مولکولی جدایه‌های ازتوباکتر

جهت انجام تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[4] (PCR)، DNA ژنومیک جدایه‌های ازتوباکتر به روش استفاده از نمک[5] استخراج شد و خلوص DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ با توجه به پروتکل شرکت ترموفیشر بر اساس نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر از نظر آلودگی با فنل و پروتئین بررسی گردیدند. جهت تایید قطعی DNAهای استخراج شده از جدایه‌ها و همچنین جهت کنترل داخلی، از پرایمرهای 16S rRNA یونیورسال شرکت ژن فناوران برای واکنش زنجیره پلیمراز استفاده شد.

پرایمر پیشرو:
5’AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3’
پرایمر معکوس:
5’GGTTACCTTGTTACGACTT3’

واکنش زنجیره پلیمراز با برنامه دمایی و زمانی ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و سپس ۶۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس با ۳۵ سیکل انجام شد. سپس محصول واکنش زنجیره پلیمراز بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و بررسی شد.

۱ - *Azotobacter chroococcum*
۲ - *Azotobacter vinelandii*
۳ - Ashby
۴ - Polymerase Chain Reaction
۵ - Salting out

طراحی پرایمر جهت شناسایی و افتراق ژن *nif* H

پرایمرهای دژنره بر اساس باکتری‌های استاندارد ازتوباکتر کروکوکوم IBRC-M 10787 و ازتوباکتر وینلاندی IBRC-M 10786 در پایگاه اطلاعات داده‌ای بانک ژنتیکی[1] انتخاب شد، سپس با استفاده از Database NR در مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) برای کاربرد بر روی جدایه‌های این پژوهش، طراحی و مورد تحلیل بیوانفورماتیکی توسط نرم‌افزار Gene Runner قرار گرفتند.

توالی پرایمرهای دژنره:

IGK3 (Sense Strand 5'>3'): GCIWTHTAYGGIAARGGIGGIATHGGIAA

DVV (Anti sense Strand 5'>3'): ATIGCRAAICCICCRCAIACIACRTC (GAYGTIGTITGYGGIGGITTYGCIAT)

توالی پرایمرهای نهایی:

سایز محصول : ۳۹۵bp

پرایمر پیشرو

5'GCAATTTACGGCAAGGGTGGTATC GGCAA 3' ۲۹bp

Hairpin/Dimer dG: 2/1, 0/7

TM (Nearest Nbr): 65/91c

پرایمر معکوس:

5'ATGGCGAAGCCGCCACACACCACG TC3' ۲۹bp

Hairpin/Dimer dG: -5/8, 0/6

TM (Nearest Nbr): 66/5c

جهت تعیین دمای ذوب (Tm) محصول واکنش زنجیره پلیمراز برای سویه‌های استاندارد از واکنش زنجیره پلیمراز گرادیانت استفاده شد. برنامه دمایی این واکنش، پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ ثانیه در دمای ۶۶ درجه سلسیوس و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس با ۳۵ سیکل بود. همچنین، جهت افتراق منحنی‌های ذوب برای جدایه‌های مورد نظر از واکنش زنجیره پلیمراز ریل تایم[2] به‌روش ذوب با تفکیک بالا (HRM) با استفاده از کیت تاکارا با دستگاه Rotor Gene Q 48 مطابق با برنامه دمایی پرایمر و کیت، استفاده گردید.

بررسی اثر جدایه‌های ازتوباکتر بر رشد گیاه گوجه‌فرنگی

آماده‌سازی مایه تلقیح میکروبی

بدین منظور، از کلنی‌های کشت ۲۴ ساعته ازتوباکتر بر روی محیط اشبی آگار، به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اشبی براث تلقیح شد و در دور گردشی ۱۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور گرماگذاری شد تا به کدورتی معادل نیم مک فارلند برسد.

کاشت بذرها و تیمار با مایه تلقیح میکروبی

به‌منظور آماده‌سازی بذرها جهت کاشت در گلدان و تیمار با مایه تلقیح میکروبی، ابتدا بذرها به مدت ۱۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت پنج ثانیه در هیپوکلرات ۱۰ درصد غوطه‌ور شدند و در آخر با آب مقطر استریل به‌خوبی شستشو داده شدند. بذرهای آماده شده در عمق مناسبی از سطح خاک اتوکلاو شده (کوکوپیت پرلیت) در گلدان‌های استریل قرار داده شدند و به میزان پنج میکرولیتر از مایه تلقیح ازتوباکتر به آنها اضافه شد (Esbati *et al.*, 2014). در نهایت گلدان‌ها در فیتوترون در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۴ روز قرار داده شدند. گلدان‌ها هر دو روز یک‌بار بسته به میزان رطوبت خاک با مقدار لازم آب مقطر استریل آبیاری شدند و در طی مدت زمان مطالعه، طول ساقه و طول

۱ - Gene Bank

۲ - Real-time PCR

ریشه آنها مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی، سه گلدان برای هر ایزوله ازتوباکتر، دو گلدان به‌عنوان کنترل منفی و سویه استاندارد ازتوباکتر PTCC ۱۶۵۸ به‌عنوان کنترل مثبت در نظرگرفته شدند. برای کنترل منفی به‌جای مایه تلقیح میکروبی، آب مقطر اضافه شد.

بهینه‌سازی شرایط رشد (سرعت هوادهی، دما، اسیدیته، منبع کربن و نیتروژن) جدایه ازتوباکتر منتخب

ابتدا سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/mL) در محیط کشت اشبی تهیه شد. سپس به‌منظور تعیین سرعت هوادهی مناسب، به‌میزان دو درصد از سوسپانسیون باکتریایی به ارلن‌های حاوی محیط کشت اشبی براث تلقیح شد و کشت‌ها در دورهای گردشی ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور گرماگذاری شدند. در نهایت میزان رشد باکتریایی با شمارش کلونی‌ها تعیین گردید. جهت دست‌یابی به دمای بهینه رشد، تحت شرایط مشابه آزمون بهینه‌سازی هوادهی و تلقیح دو درصدی سوسپانسیون باکتریایی، کشت‌ها در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس با دور هوادهی بهینه به‌دست آمده گرماگذاری شدند و تاثیر دماهای مختلف بر میزان رشد بررسی گردید. در ارتباط با تعیین pH مناسب رشد، محیط اشبی براث با استفاده از اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم بر روی pHهای ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸ تنظیم گردید و پس از تلقیح دو درصدی سوسپانسیون باکتریایی، کشت‌ها به مدت ۴۸ ساعت تحت دما و دور هوادهی بهینه به‌دست آمده گرماگذاری شدند و میزان رشد در اسیدیته‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفت.

به‌منظور بهینه‌سازی شرایط کشت از نظر منبع کربن، محیط کشت اشبی براث بدون منبع قند تهیه و سترون گردید و قندهای مونوساکارید گلوکز، گزیلوز و آرابینوز، قندهای دی‌ساکارید ساکارز، مالتوز و لاکتوز، قند پلی‌ساکارید نشاسته و قند الکلی مانیتول پس از سترون‌سازی با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میلی‌پور به‌طور مجزا به محیط‌های کشت افزوده شدند، سپس دو درصد سوسپانسیون باکتریایی به آنها تلقیح گردید و تحت شرایط هوادهی، دمایی و اسیدیته بهینه به دست آمده به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند و میزان رشد باکتریایی هر ارلن با قندهای متفاوت بررسی گردید. جهت تعیین منبع نیتروژن مناسب، محیط کشت اشبی براث همراه با قند منتخب و بدون منبع نیتروژن تهیه گردید و منابع نیتروژنی آلی پپتون و عصاره مخمر و همچنین منبع نیتروژنی معدنی نیترات سدیم به‌طور مجزا به محیط‌های کشت با pH بهینه افزوده شدند. پس از تلقیح ۲ درصدی سوسپانسیون باکتریایی، کشت‌ها تحت شرایط بهینه هوادهی و دمایی به‌دست آمده به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور گرماگذاری شدند. لازم به ذکر است که برای بررسی شرایط بهینه، هر آزمون با سه بار تکرار انجام شد. در این تحقیق، آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۸ و به روش آزمون 2-sample t Test و ضریب اطمینان ۹۵ درصد برای تعیین سطح معنی‌دار ۰/۰۵ بین گروه‌های آزمایش (مقایسه بین تیمارها و فرایند بهینه‌سازی شرایط رشد ایزوله برتر) انجام گردید.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی مقدماتی ازتوباکتر

برطبق یافته‌های موجود مبنی بر خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی جنس ازتوباکتر، ۳۲

جدایه در تشخیص اولیه به‌عنوان ازتوباکتر در نظر گرفته شدند (Dadok *et al.*, 2014). به این صورت‌که در بررسی ماکروسکوپی (مشخصات ظاهری کلونی‌ها)، کلنی‌های تازه به رنگ سفید مایل به کرم، دارای سطح صاف و موکوئیدی مشاهده شد، درحالی‌که در کشت‌های کهنه، سلول‌های ازتوباکتر به‌صورت متراکم و کروی شکل با دیواره ضخیم بودند که نشان‌دهنده تشکیل کیست در محیط کشت می‌باشد. در نتیجه بررسی میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ توسط میکروسکوپ نوری، کوکسی‌هایی گرم منفیo به رنگ قرمز و صورتی روشن در اشکال میله‌ای و کروی مشاهده شد (شکل ۱). سپس جدایه‌های فرضی ازتوباکتر از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی تحت غربالگری اولیه قرار گرفتند. با توجه به مطالعات پیشین، ایزوله‌هایی که تست‌های کاتالاز، سیترات، اوره‌آز، حرکت (SIM) و تست قندهای گلوکز، مالتوز و گالاکتوز آنها مثبت بود متعلق به جنس ازتوباکتر در نظر گرفته شدند (Rajaee *et al.*, 2007). بنابراین، در پژوهش حاضر، از بین ۳۲ جدایه باکتریایی جدا شده از نمونه‌های خاک، ۲۷ جدایه به‌عنوان ازتوباکتر انتخاب و سپس جهت تایید بیشتر مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند.

شناسایی پیشرفته مولکولی جدایه‌های ازتوباکتر

پس از استخراج DNA باکتریایی، نتیجه نانودراپ نمونه‌ها برای غلظت بین ۳۲-۴۷ نانوگرم بر میکرولیتر، و ضریب جذب آنها ۱/۸-۲ ارزیابی شد که نشان‌دهنده غلظت مورد قبول و کیفیت خوب استخراج‌ها برای انجام ادامه پژوهش بود. سپس بررسی مولکولی16S rRNA جهت تایید قطعی DNA باکتریایی و خلوص DNA بر روی جدایه‌ها انجام شد. بدین منظور، بخشی از DNA که برای اهداف تاکسونومیک به‌کار می‌رود و در تمام باکتری‌ها عمومیت دارد یعنی ژن16S rRNA در نظر گرفته شد (Tran *et al.*, 2017). تایید اولیه حضور DNA باکتریایی در ۲۸ نمونه بر روی ژل الکتروفورز پس از انجام واکنش زنجیره پلیمراز با پرایمرهای 16S rRNA، و ظهور قطعه ۱۲۵۰ جفت بازی (bp) بر روی ژل آگارز ۱ درصد توسط مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی به‌روش الکتروفورز تایید شد (شکل ۲). دمای ذوب پرایمرها به‌روش نزدیک‌ترین همسایه[1] محاسبه و از نظر انرژی آزاد گیبس برای پیش‌بینی ساختارهای ثانویه مورد تحلیل قرار گرفتند. به‌علاوه مطالعات نشان دادند که می‌توان از طریق تکنیک‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و اثبات حضور ژن *nif* در ژنوم باکتری وجود سیستم آنزیمی نیتروژناز را تایید کرد (Haghighi *et al.*, 2011; Dadok *et al.*, 2013). بنابراین، در مرحله بعد جدایه‌ها با کمک تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز ریل تایم و اختلاف در دمای ذوب محصول و در حضور سویه‌های استاندارد (ازتوباکتر وینلاندی، ازتوباکتر کروکوکوم) از نظر حضور ژن *nif*H در ژنوم آنها مورد آزمایش قرار گرفتند و از یکدیگر افتراق داده شدند. با توجه به این که ژن کد کننده *nif*H دارای توالی حدود ۳۰۰ جفت بازی (bp) است، باندها بر روی ژل با توجه به مارکر، بر روی ۳۰۰ جفت بازی مشاهده شدند (شکل ۳). نتایج بررسی وجود ژن *nif*H در نمونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز ریل تایم (شکل ۴) با توجه به پیک‌های ظاهر شده، به‌صورت زیر حاصل شد (جدول ۱):

۱ - Nearest Neighbor

۱) جدایه‌های شماره ۳، ۵، ۱۷، ۲۱ و ۲۶ به عنوان باکتری ازتوباکتر وینلاندی شناسایی شدند.

۲) سایر جدایه‌ها به جز سویه شماره ۲۸ هر دو ژن *nif*H را داشتند.

۳) سویه شماره ۲۸ فاقد ژن *nif*H بود.

تاثیر جدایه‌های ازتوباکتر بر رشد ساقه و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی

در این مطالعه، اثربخشی ۲۷ جدایه ازتوباکتر روی رشد ساقه و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۵ و شکل ۶ به‌ترتیب نتایج حاصل از تاثیر تلقیح جدایه‌های ازتوباکتر بر رشد ساقه (روزهای ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰،۲۴، ۲۶ ،۳۰ و ۳۴) و ریشه (روز ۳۴) گیاه گوجه‌فرنگی طی مدت زمان ۳۴ روز را نمایش می‌دهند. در طول مدت بررسی، جوانه‌زنی تعدادی از بذرها در روز شش مطالعه و تعدادی در روزهای بعدی مشاهده شد. براساس نتایج به‌دست آمده تمامی جدایه‌ها نسبت به کنترل منفی تاثیر قابل ملاحظه‌ای ($P<۰/۰۵$) بر رشد ساقه گیاه داشتند، که از میان آنها، جدایه شماره ۲۱ در مقایسه با سایر جدایه‌ها و ازتوباکتر استاندارد بیشترین اثر بخشی را داشت و به دنبال آن جدایه‌های شماره ۳، ۵، ۷، ۱۶، ۱۹، ۲۲، ۲۳، ۲۵ و ۲۶ نیز اثر افزایشی مطلوبی را نشان دادند.

در ارتباط با تاثیر تلقیح جدایه‌های ازتوباکتر بر رشد ساقه، در روز ۳۴ مطالعه طول ریشه‌ها اندازه‌گیری شد که جدایه‌های ازتوباکتر بومی این تحقیق نسبت به سویه استاندارد و کنترل منفی افزایش چشم‌گیری ($P<۰/۰۵$) را نشان دادند که در این مورد نیز بهترین اثربخشی مربوط به جدایه شماره ۲۱ بود. براساس آنالیز آماری صورت گرفته تمامی جدایه‌ها افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در طول ساقه و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی نسبت به سویه استاندارد و کنترل منفی نشان دادند که از میان آنها، جدایه شماره ۲۱ بیشترین روند افزایشی را در رشد ساقه و ریشه گیاه در طی ۳۴ روز مطالعه ایجاد کرد. آلالاف و همکاران (Alalaf, 2020) نیز تاثیر سویه‌های مختلف ازتوباکتر و میکوریز درونی را بر جوانه‌زنی و ریشه‌زایی گیاه سیب در شرایط گلخانه‌ای بررسی و نتیجه گرفتند تیمارهایی که با تلقیح ازتوباکتر کروکوکوم همراه بودند، علاوه براینکه درصد جوانه‌زنی بالاتری داشتند، دارای میزان کلروفیل بالاتر و شاخص سطح برگ بیشتری نیز بودند.

کاربرد جنس ازتوباکتر به‌عنوان کود بیولوژیک بیش از یک قرن است که مورد توجه قرار گرفته است (Soumare *et al*., 2020). مطالعات اخیر نیز ثابت کرده‌اند که استفاده از سویه‌های ازتوباکتر به‌عنوان یک ماده مغذی زیستی برای طیف وسیعی از محصولات (غلات، گوجه‌فرنگی، بادمجان، هویج و نیشکر) منجر به نتایج بهتری در ویژگی‌های رشد گیاهان می‌شود (Arora *et al*., 2018; Aasfar *et al*., 2021). همچنین، گزارش شده است که در خاک غیراستریل نسبت به خاک استریل، رشد طولی ریشه و بخش هوایی گیاه افزایش بیشتری دارد که این مسئله نشان‌دهنده تولید مواد محرک رشد توسط میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که بر روی رشد گیاه اثر مثبت می‌گذارند (Soleimanifard *et al*., 2022).

در مطالعه‌ای که در آن بذرهای گوجه‌فرنگی با باکتری آزوسپیریلوم تلقیح شده بود، اثر مثبت معنی‌داری بر تمامی صفات، غیر از صفت طول ریشه مشاهده شد، یعنی تیمارهای حاوی باکتری به‌دلیل تولید مواد محرک رشد گیاهی نسبت به شاهد (بدون باکتری) برتری داشتند (Esbati *et*

al., 2014). همچنین، در مطالعه مرتبط دیگری که اثربخشی ازتوباکتر را به‌عنوان کود بیولوژیک بر ویژگی‌های رشد گیاه ذرت سنجیدند به این نتیجه رسیدند که گیاه ذرت تحت تیمار با ازتوباکتر افزایش رشد چشم‌گیری را در اندازه برگ‌ها و رشد کمتری را در طول ریشه نسبت به گیاه کنترل (بدون باکتری) نشان داد که خود بیان کننده وجود مقادیر کافی مواد غذایی در خاک می‌باشد که نیازی به افزایش طول ریشه نبوده است (Mukhtar *et al*., 2018). به‌نظر می‌رسد گونه‌های مختلف ازتوباکتر توانایی تولید انواع هورمون‌های محرک رشد را دارند به‌طوری‌که اثر تلقیح ازتوباکتر به‌عنوان باکتری محرک رشد بر روی گیاه ذرت قابلیت جذب نیتروژن و فسفر و میزان محصول ذرت را به‌طور قابل توجهی افزایش داد (Hasanudin, 2003). بنابراین، طبق شواهدی که در بالا ذکر شد، وجود باکتری‌ها از جمله ازتوباکتر در خاک بسیار حایز اهمیت می‌باشد.

نتایج بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه ازتوباکتر منتخب

در تحقیق حاضر، شرایط رشد جدایه برتر (شماره ۲۱) انتخاب شده از مرحله قبل، از نظر تأثیر عوامل و پارامترهای محیطی، اکولوژیکی و غذایی از جمله pH، دما، منبع کربن، منبع نیتروژن و سرعت هوادهی بهینه‌سازی شد. جدول شماره ۲ نتایج بررسی شرایط مختلف محیطی جهت بهبود و توسعه رشد جدایه شماره ۲۱ را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل و بررسی شمارش جمعیت میکروبی، بهترین دور گردشی جهت هوادهی جدایه منتخب ۲۰۰rpm به‌دست آمد. دورهای گردشی ۱۵۰ و ۲۵۰ در درجات بعدی مورد اهمیت قرار داشتند. دمای ۳۰ درجه سلسیوس بهترین دما جهت رشد و تکثیر در نظر گرفته شد و دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس به‌ترتیب در درجات بعدی مورد اهمیت قرار گرفتند. طبق بررسی‌های به‌عمل آمده مشخص شد که pH=۷/۰، بهترین pH جهت رشد و تکثیر می‌باشد، pHهای ۷/۵ و ۶/۵ در درجات بعدی اهمیت در نظر گرفته شدند. در آزمون‌های انجام شده مشاهده شد که بهترین منبع کربن جهت رشد و تکثیر سویه اصلح مانیتول بوده و ساکارز، گلوکز، مالتوز، گزیلوز، نشاسته، لاکتوز و آرابینوز به‌ترتیب بعد از مانیتول در افزایش رشد مؤثر بودند. همچنین، مناسب‌ترین منبع نیتروژن پپتون بود و بعد از پپتون به‌ترتیب عصاره مخمر و نیترات آمونیوم در مراتب بعدی قرار گرفتند. همسو با مطالعه حاضر، دیگر دانشمندان نیز گزارش کردند درجه حرارت بر روی رشد ازتوباکتر کروکوکوم مؤثر است که باید در محدوده ۲۸ تا ۳۲ درجه سلسیوس نگه داشته شود، در حالی که pH باید بین ۷/۰ و ۷/۵ نگه داشته شود. غلظت اکسیژن محلول و ترکیب محیط کشت (به خصوص غلظت نمک) نیز تأثیر قابل توجهی بر رشد باکتری دارد (Mukhtar *et al*., 2018; Romero-Perdomo *et al*., 2017; Kurdish *et al*., 2006).

با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیطی و اقلیمی زیستگاه اصلی‌شان، تولید کود بیولوژیک از باکتری‌های غیربومی که از مناطقی با ویژگی‌های اقلیمی متفاوت نسبت به شرایط داخلی کشور به‌دست آمده‌اند از کارآیی مطلوبی برخوردار نخواهند بود. بنابراین، استفاده از باکتری‌های بومی که با شرایط زیستی کشور سازگار هستند در تولید کودهای بیولوژیک مناسب‌تر می‌باشند. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد باکتری‌های جنس ازتوباکتر می‌توانند

در سطوح بسیار گسترده، برای گیاه گوجه‌فرنگی سودمند باشند.

نتیجه‌گیری کلی

باتوجه به نتایج پژوهش حاضر بهینه‌سازی پارامترهای کشت و تغذیه‌ای منجر به افزایش رشد گونه‌های ازتوباکتر شد. اضافه کردن ازتوباکتر به خاک، ویژگی‌های رشد گیاه گوجه‌فرنگی را بهبود بخشید. بنابراین، جدایه‌های ازتوباکتر به‌دست آمده از مناطق بومی تهران، پتانسیل کاربرد در صنعت کشاورزی را دارند، به‌ویژه جدایه برتر (شماره ۲۱) که تحت شرایط بهینه به‌دست آمده در این مطالعه پس از بررسی‌های بیشتر، امکان استفاده به‌عنوان کود بیولوژیک را دارا می‌باشد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق برای حمایت از این پروژه کمال تشکر را دارند.

جدول ۱- نتیجه واکنش زنجیره پلی‌مراز ریل تایم جدایه‌های ازتوباکتر

Table 1- Result of Real Time Polymerase Chain Reaction of *Azotobacter* isolates

ژن Gene	نام باکتری Name of bacteria	شماره جدایه Isolate No.
*nif*H 1	*Azotobacter vinelandii*	3,5,17,21,26
*nif*H 1 & *nif*H 2	*Azotobacter*	1, 2 , 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27
Negative	-	28

جدول ۲- میانگین جمعیت جدایه شماره ۲۱ تحت تاثیر پارامترهای مختلف محیطی

Table 2 - Mean of isolate No. 21 population under different environmental parameters

دور هوادهی Aeration (rpm)	150			200			250	
•جمعیت باکتریایی Bacterial population (Log CFU/ml)	7.63±0.028*			8.15±0.031**			7.26±0.027*	
دما Temperature (°C)	25			30			35	
•جمعیت باکتریایی Bacterial population (Log CFU/ml)	7.89±0.029*			8.28±0.033**			7.91±0.03*	
pH	5.5		6	6.5		7	7.5	8
•جمعیت باکتریایی Bacterial population (Log CFU/ml)	6.46±0.025*		7.94±0.03*	8.23±0.032*		8.30±0.033**	8.24±0.032*	6.47±0.025*
منبع کربن Carbon source	**مانیتول** Mannitol	**گلوکز** Glucose	**ساکارز** Sucrose	**گزیلوز** Xylose	**آرابینوز** Arabinose	**مالتوز** Maltose	**لاکتوز** Lactose	**نشاسته** Starch
•جمعیت باکتریایی Bacterial population (Log CFU/ml)	8.75±0.034**	7.94±0.03*	8.33±0.033*	4.64±0.018*	4.23±0.015*	5.59±0.022*	4.20±0.015*	4.46±0.016*
منبع نیتروژن Nitrogen source	**پپتون** Peptone		**عصاره مخمر** Yeast extract			**نیترات آمونیوم** Ammonium nitrate		
•جمعیت باکتریایی Bacterial population (Log CFU/ml)	8.71±0.033**		6.62±0.025*			7.75±0.028*		

• جمعیت باکتریایی: میانگین لگاریتم شمارش جمعیت باکتریایی ± انحراف معیار

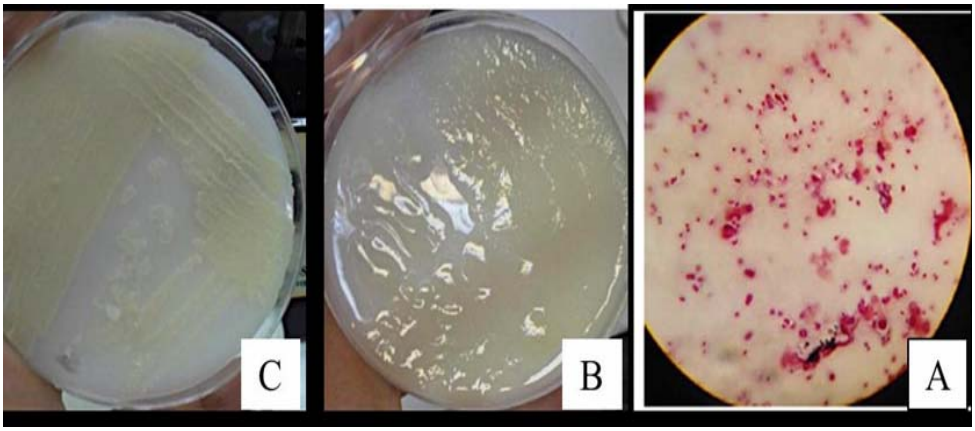
• Bacterial population: mean logarithm of Bacterial population count ± Standard Deviation

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین داده‌ها در هر پارامتر

*Indicates significant differences (p<0.05) between data in each parameter

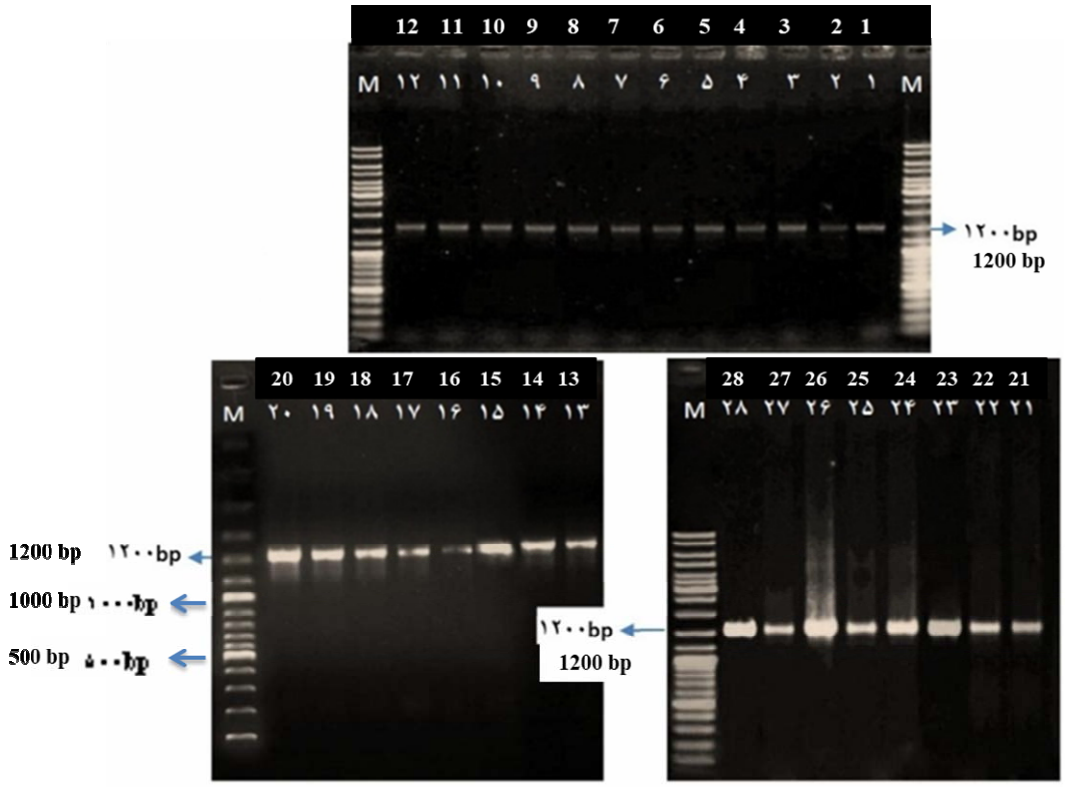
**نشان‌دهنده بیشترین اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نسبت به سایر نتایج در پارامتر مربوطه

**Indicates the most significant difference (p<0.05) compared to other results in the relevant parameter



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی (A) و ماکروسکوپی کشت تازه (B) و تصویر ماکروسکوپی کشت کهنه (C) جدایه ازتوباکتر در محیط کشت اختصاصی اشبی

Figure 1- (A-C) Microscopic (A) and macroscopic images of fresh culture (B) and macroscopic image of old culture (C) from *Azotobacter* isolate in specific Ashby culture medium

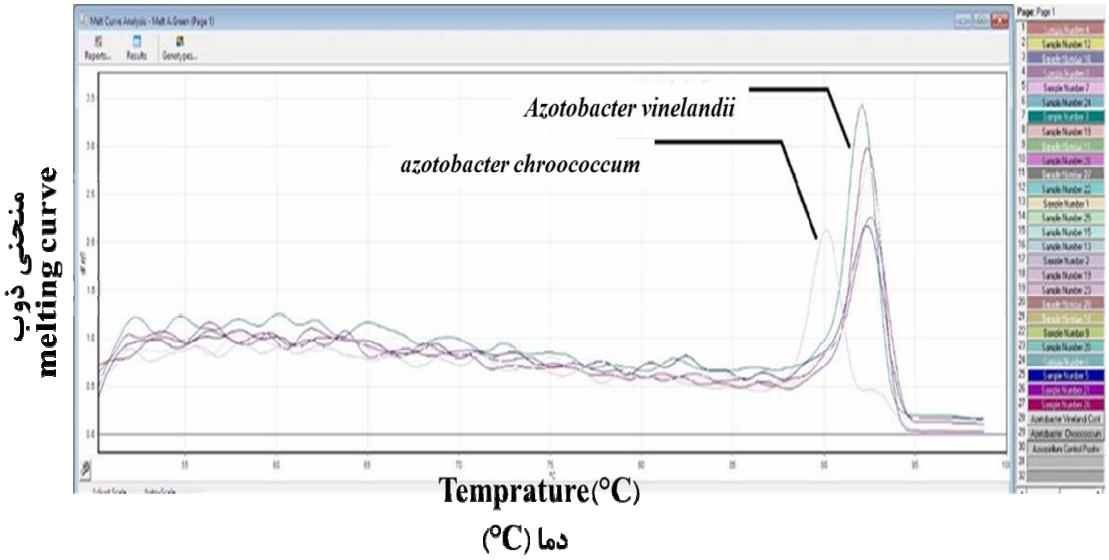


شکل ۲- نتایج تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره پلی‌مراز بر روی ژل الکتروفورز. ستون M: سایز مارکر (۱kb) ستون ۱-۲۸ : نمونه ها

Figure 2- Results of 16S rRNA amplification using PCR technique on gel electrophoresis. Well M: Size Marker (1kb), Well 1-28: Samples

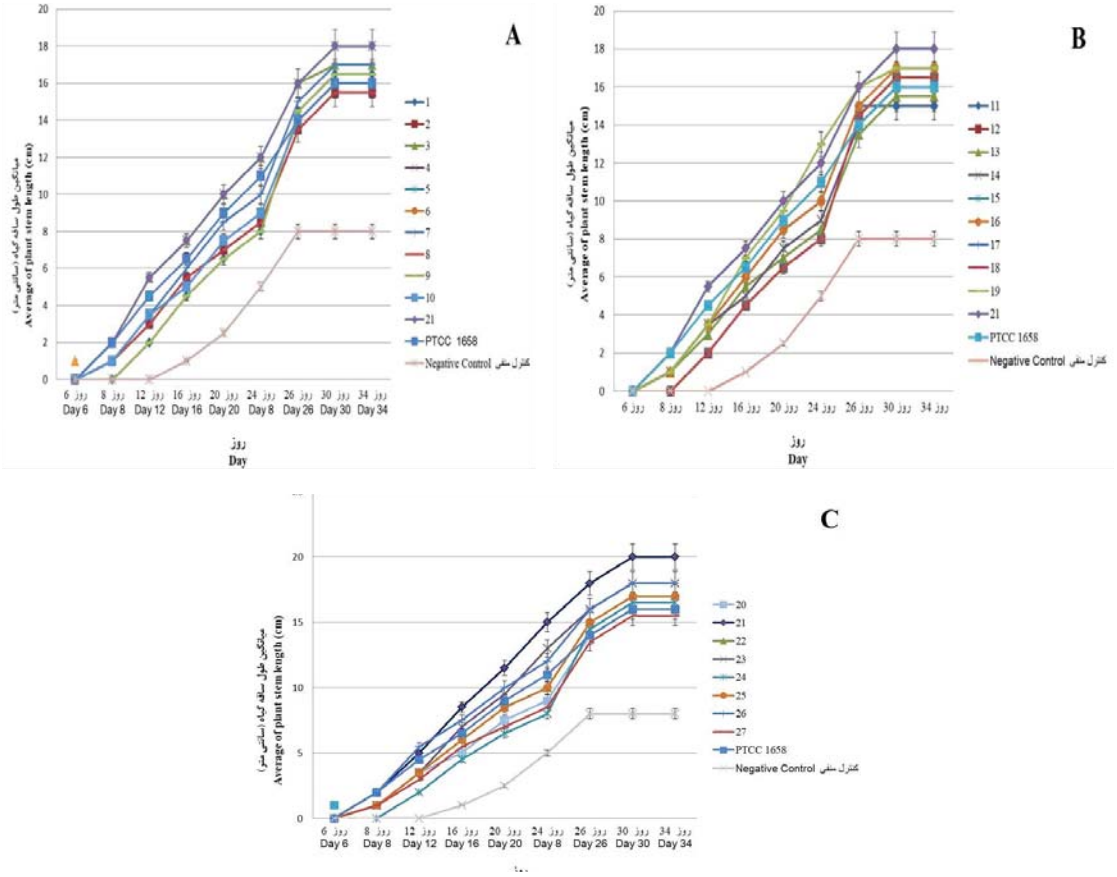
شکل ۳- نتایج تکنیک واکنش زنجیره پلی‌مراز گرادیانت جهت شناسایی ژن *nif*H در ایزوله های مورد مطالعه

Figure 3- Results of gradient polymerase chain reaction technique to identify *nif*H gene in studied isolates



شکل ۴- نمونه‌ای از منحنی تفکیک (منحنی ذوب) بر اساس دما (محور افقی) مربوط به ازتوباکتر وینلاندی و ازتوباکتر کروکوکوم به‌دست آمده از واکنش زنجیره پلی‌مراز ریل تایم به‌روش ذوب با تفکیک بالا (HRM)

Figure 4- An example of melting curve based on temperature (horizontal axis) for *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter crococum* obtained from the Real Time polymerase chain reaction (HRM).

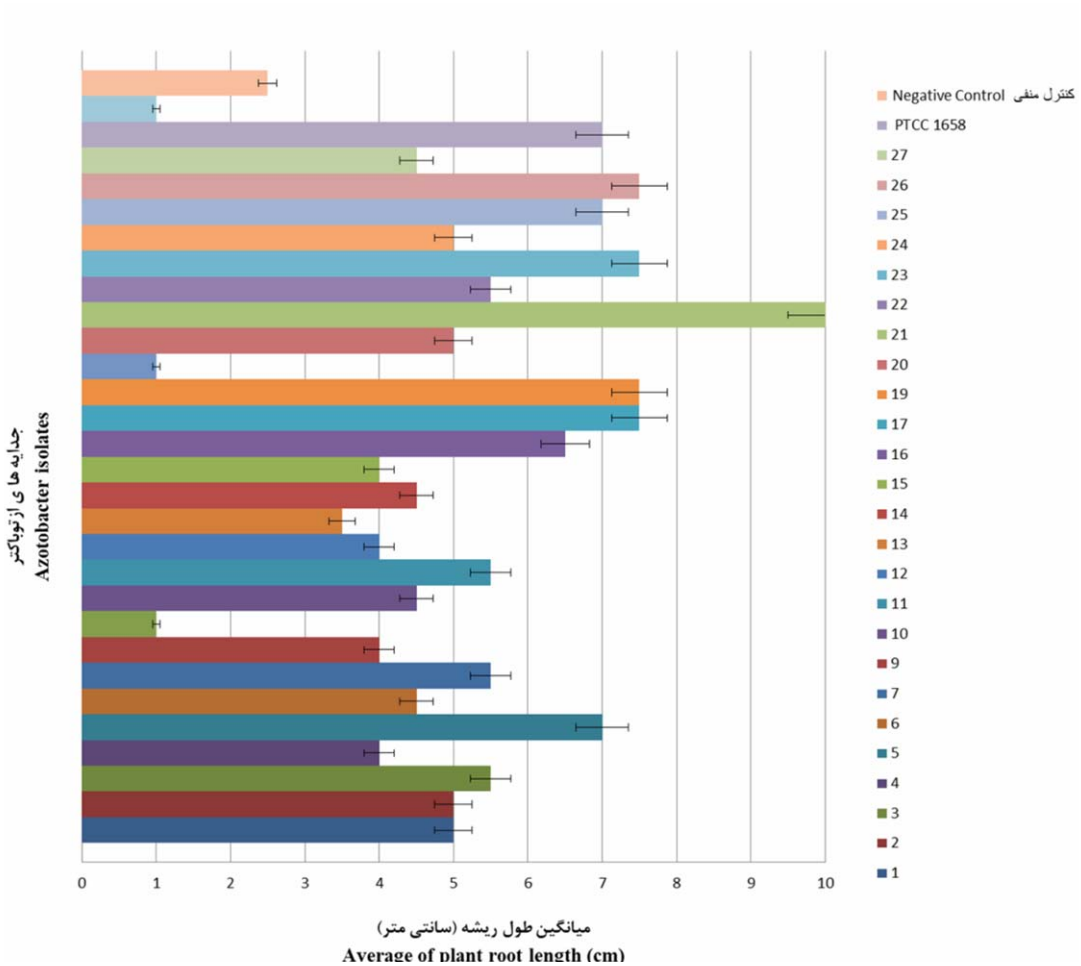


شکل ۵ (A-C)- نتایج تاثیر تلقیح جدایه‌های ازتوباکتر بر رشد ساقه گیاه گوجه‌فرنگی طی ۳۴ روز مطالعه

Figure 5 (A-C)- Results of the inoculation effect of *Azotobacter* isolates on tomato stem growth within 34 days of study

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار در مقایسه با سویه استاندارد و کنترل منفی با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ارایه شده است.

Data are represented as average± means of standard deviation compared to standard strain and negative control with a 95% confidence interval



شکل ۶- نتایج تاثیر تلقیح جدایه‌های ازتوباکتر بر رشد ریشه گیاه گوجه‌فرنگی طی ۳۴ روز مطالعه

Figure 6- Results of the inoculation effect of *Azotobacter* isolates on tomato root growth within 34 days of study

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار در مقایسه با سویه استاندارد و کنترل منفی با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ارایه شده است.

. Data are represented as average± means of standard deviation compared to standard strain and negative control with a 95% confidence interval

References منابع مورد استفاده

- Aasfar, A., A. Bargaz, K. Yaakoubi, A. Hilali, I. Bennis, Y. Zeroual, and I. Meftah Kadmiri. 2021. Nitrogen fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology*. 12: 628379.
- Alalaf, A. H. 2020. The role of biofertilization in improving fruit productivity: a review. International Journal of Agricultural and Statistical Sciences. 16: 107-112.
- Ardakani, M.R., D. Mazaheri, and G. Nourmohammadi. 2001. Effect of azospirillum, mycorrhiza and streptomyces with manure utilization on yield and yield component of wheat (mahdavi var.). *Journal of Agriculturan Science*. 7: 1- 16.
- Arora, M., P. Saxena, M.Z. Abdin, and A. Varma. 2018. Interaction between *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* governs better plant physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua* L. plants grown under in vitro conditions. *Symbiosis*. 75: 103–112.
- Aseri, G.K., N. Jain, J. Panwar, A.V. Rao, and P.R. Meghwal. 2008. Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Scientia Horticulturae*. 117: 130–135.
- Chavada, N.B., R. Patel, S. Vanpuria, B.P. Raval, and P.V. Thakkar. 2010. A study on isolated diazotrophic (non-symbiotics) bacteria from saline desert soil as a biofertilizer. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Researches*. 1: 52–54.
- Dadok, M., M. Beglarian, S. Mehrabian, H. Zali, M. Zamanian azodi, and M. Salehi. 2013. Phylogenetic identification of nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of asparagus plants using 16s rRNA and the effect of zinc on isolated strains. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 20(5): 112–20.
- Dadok, M., Mehrabian, S., Salehi, M., and Irian, S. 2014. Morphological, biochemical and molecular characterization of twelve nitrogen-fixing bacteria and their response to various zinc concentration. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7:
- Das, K., R. Dang, and T.N. Shivananda. 2008. Influence of bio-fertilizers on the availability of nutrients (N, P and K) in soil in relation to growth and yield of Stevia rebaudiana grown in South India. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 1: 20-24.
- Dupin, S.E., R. Geurts, and E.T. Kiers. 2020. The non-legume *Parasponia andersonii* mediates the fitness of nitrogen-fixing rhizobial symbionts under high nitrogen conditions. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1779-1789.
- El-Zeiny, O.A.H. 2007. Effect of biofertilizers and root exudates of two weed as a source of natural growth regulators on growth and productivity of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Biological Science*. 3: 440–446.
- Esbati, M., A. Akhavan Sepahi, A. Asgharzadeh, and M. Khosrow Shahli. 2014. Isolation, identification and population study of *Azospirillum* sp. In soils around

Tehran and evaluation of their growth stimulant effects on tomato plants under greenhouse conditions. *Soil Biology*. 2(1): 43-54. (In Persian).

- Haghighi, S., T.S. Nejad, and S. Lack. 2011. Calculate the growth dynamics of root and shoot of bean plants. *Journal of American Science*. 7: 19–26.
- Hajeeboland, R., N. Asgharzadeh, and Z. Mehrfar. 2004. Ecological study of Azotobacter in two pasture lands of the north-west Iran and its inoculation effect on growth and mineral nutrition of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Omid) plants. *JWSS-Isfahan University of Technology*. 8: 75–90. (In Persian).
- Hasanudin, H. 2003. Increasing of the nutrient and uptake avaliability of N and P and through corn yield of inoculation of mycorrhiza, azotobacter and on ultisol organic matter. *Journal of Agriculture Sciences of Indonesia*. 5: 83–89.
- Khosravi, H., and H. Mohammadi. 2013. Investigation of the effects of inoculation of Tobacteria with fertilizer on dryland wheat. *Journal of Soil Management and Sustainable Production.* 3(2): 219-205. (In Persian).
- Kumar, V., R.K. Behl, and N. Narula. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of Azotobacter chroococcum in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological Research.* 156: 87–93.
- Kumar, V., and K.P. Singh. 2001. Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Bioresource Technology*. 76: 173–175.
- Kumar, G.P., S.K. Yadav, P.R. Thawale, S.K. Singh, and A.A. Juwarkar. 2008. Growth of Jatropha curcas on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and Azotobacter –A greenhouse study. *Bioresource Technology*. 99: 2078–2082.
- Kurdish, I.K., Z.T. Bega, and I.Y. Tsarenko. 2006. The effects of several factors on the growth of pure and mixed cultures of Azotobacter chroococcum and Bacillus subtilis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42: 278–283.
- Martin, X.M., C.S. Sumathi, and V.R. Kannan. 2011. Influence of agrochemicals and Azotobacter sp. application on soil fertility in relation to maize growth under nursery conditions. *Eurasian Journal of Biosciences*. 5: 19–28.
- Mukhtar, H., H. Bashir, A. Nawaz, and I. Haq. 2018. Optimization of growth conditions for Azotobacter species and their use as biofertilizer. *Jounnal of Bacteriology and Mycology.* 6: 274-278.
- Nosheen, A., A. Bano, and F. Ullah. 2016. Bioinoculants: a sustainable approach to maximize the yield of Ethiopian mustard (*Brassica carinata* L.) under low input of chemical fertilizers. *Toxicology and Industrial Health.* 32: 270–277.
- Rajaee, S., H.A. Alikhani, and F. Raiesi. 2007. Effect of plant growth promoting potentials of Azotobacter chroococcum native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat. *Journal of Crop Production and Processing*. 11: 285–297. (In Persian).
- Soleimanifard, A., M. Mojaddam, S. Lack, and M. Alavifazel. 2022. Effect of azotobacter and nitrogen fertilizer levels on agro-physiological traits and yield of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes under different moisture conditions.

Journal of Crop Ecophysiology. 15: 467-492.

- Soumare, A., A.G. Diedhiou, M. Thuita, and M. Hafidi. 2020. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. *Plants*. 9: 1011-1033.
- Romero-Perdomo, F., J. Abril, M. Camelo, A. Moreno-Galván, I. Pastrana, D. Rojas-Tapias, and R. Bonilla. 2017. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiologia*. 49: 377-383.
- Tran, Q., D.T. Pham, and V. Phan. 2017. Using 16S rRNA gene as marker to detect unknown bacteria in microbial communities. *BMC Bioinformatics*. 18: 155-161.
- Yasari, E., M.A.E. Azadgoleh, S. Mozafari, and M.R. Alashti. 2009. Enhancement of growth and nutrient uptake of rapeseed (*Brassica napus* L.) by applying mineral nutrients and biofertilizers. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12: 127–133.

Research Article DOI: 10.30495/JCEP.2022.1911464.1719

Isolation of Indigenous *Azotobacter* from the Soil of Different Regions of Tehran and Investigating the Effect of Their Inoculation on Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Plant Growth

Shaghayegh Golchin Irani[1], Gholamreza Taheri Sangsari[2*], Akram Sadat Tabatabaee Bafroee[3] and Mohammad Javad Avesta[4]

Received: October 2020 , Revised: 18 August 2021, Accepted: 22 August 2021

Abstract

Azotobacter is an aerobic, gram negative and chemoorganotrophic bacterium, that is able to stabilize molecular nitrogen nonsymbiotically. The role of *Azotobacter* in plant growth is due to the production of growth-promoting hormones, the ability to dissolve insoluble phosphates, nitrogen fixation, increase stress resistance and biocontrol of plant pathogens. The aim of this study was to isolate and identify the indigenous *Azotobacter* from the soil of different areas of Tehran. The effect of tomato plant inoculation with isolates on growth promoting was also investigated. Finally, the growth conditions of the superior isolate were optimized**.** *Azotobacter* isolates were obtained from soil samples using serial dilution method and identified by conventional biochemical tests. The *nif* H gene, encoding nitrogenase enzyme, was identified in isolates using real-time PCR technique. Then the tomato seeds were inoculated with isolates and seedling growth rate including stem and root length were measured during 34 days. The parameters of temperature, pH, aeration rate, and carbon and nitrogen sources were optimized for superior isolate. In this study, 27 isolates were identified as nitrogen fixing *Azotobacter*. Considering the results, all isolates showed a significant increase ($p < 0.05$) in stem and root length of tomato plants compared to standard strain and negative control. Among them, isolate No. 21 had the greatest effect during 34 days of study and its best growth conditions in the presence of mannitol carbon source, peptone nitrogen source, 200 rpm rotation, $30^{\circ C}$ and pH 7were acquired. According to the results of this study, the obtained indigenous isolates particularly isolate No.21 have the potential to be used as biological fertilizer after further investigations.

Key words: *Azotobacter,* Biological fertilizer, Isolation, Optimization, Tomato plant, *nif* H.

1- MS.c. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Faculty Member, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Member of Royan Tisan Sabz Knowledge-Based Company, Tehran, Iran.
**Corresponding Author: 1978ghts@gmail.com*