کاربرد کودهای زیستی حاوی ریزجانداران آزادزی تثبیت کننده نیتروژن در کشاورزی

هوشنگ خسروی[۱]

عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات خاک و آب .hkhosravi@swri.ir

دریافت:فروردین ۱۳۹۳ و پذیرش: خرداد ۱۳۹۳

چکیده

تثبیت زیستی نیتروژن اتمسفری (N_2) پدیده‌ای انحصاری است که توسط گروه خاصی از ریزجانداران پروکاریوت به نام دی ازوتروف‌ها و توسط سیستم آنزیمی نیتروژناز آنها انجام می‌شود. این گروه شامل باکتری-ها، اکتینومیست‌ها و سیانوباکتری‌ها می‌باشند. سیستم‌های تثبیت نیتروژن شامل همزیستی، همیاری و آزادزی می-باشند. در سیستم آزادزی، بدون نیاز به حمایت گیاه، تثبیت نیتروژن انجام می شود. ازتوباکتر به عنوان اولین دی‌ازوتروف آزادزی بیش از یک قرن پیش کشف شد. حدود نیم قرن پیش این باکتری در کشاورزی به عنوان مایه تلقیح استفاده شد. امروزه در برخی کشورها مقادیر فراوانی از انواع باکتری‌های دی‌ازوتروف به عنوان مایه تلقیح مصرف می‌شود. در ایران نیز چند سالی است تولید برخی از این فرآورده‌ها آغاز شده است. حامل‌های مناسب برای تهیه مایه تلقیح باکتری‌های آزادزی شامل برخی مواد آلی و معدنی شامل تورب، پرلیت، زغال چوب، سبوس، ملاس نیشکر و سایر موارد مشابه می باشند. جمعیت موجود در مایه تلقیح معمولا به صورت تعداد ریزجانداران در میلی‌لیتر یا گرم مایه تلقیح گزارش و برای مقدار معینی بذر یا در مقیاس هکتار توصیه می شوند. کاربرد این مایه تلقیح‌ها به صورت مصرف خاکی، بذر مال، آغشته کردن نهال، یا کاربرد در منطقه ریشه درخت می باشد. ایجاد رابطه همزیستی تثبیت نیتروژن در غیر لگوم ها بویژه در غلات مهمترین چشم انداز آینده در این زمینه است. انجام تحقیقات بنیادی بر روی تثبیت نیتروژن در غلات مهمترین پیشنهادی است که در این رابطه می توان ارائه نمود.

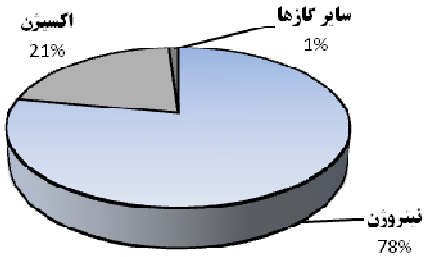
واژه های کلیدی: مایه تلقیح، هتروتروف، اتوتروف.

---

[۱]- آدرس نویسنده مسؤل: کرج، مشکین دشت، بلوار امام خمینی(ره)، مؤسسه تحقیقات خاک وآب، کد پستی: ۳۱۷۷۹۹۳۵۴۵

مقدمه

نیتروژن یکی از عناصر پرنیاز و مهم برای رشد گیاهان است. با وجود اینکه بیش از ۷۸ درصد ترکیب گازی جو زمین را نیتروژن مولکولی (N_2) تشکیل می دهد، اما این عنصر به شکل مولکولی برای گیاهان قابل جذب نبوده و بنابراین نیتروژن همچنان مهمترین عامل محدود کننده تولید محصول در جهان است (دیکسون و ویلر، ۱۹۸٦).



شکل۱- ترکیب تقریبی گازهای اتمفسر زمین

مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی یکی از راههای معمول برطرف کننده این محدودیت می باشد که از یک سو مهمترین نهاده کشاورزی مؤثر در افزایش تولید بوده و از سویی دیگر از پتانسیل آلوده سازی بالایی برخوردار است. مصرف بی رویه و غیر اصولی کودهای شیمیایی نیتروژنی باعث آلودگی نیتراتی آبهای سطحی و زیر زمینی و در نهایت موجب مسمومیت انسان، دام و آبزیان می‌شوند.

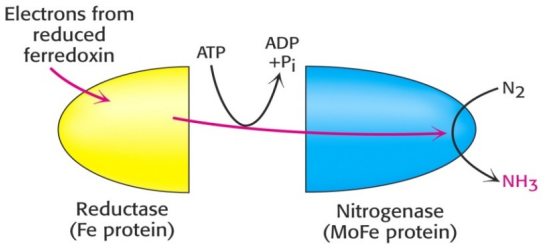
همچنین مشکل افزایش نیترات زدایی (دی نیتریفیکاسیون) و در نتیجه تولید بیشتر گازهای اکسید نیتروژنی و تخریب لایه حیاتی ازن را به همراه دارند.ظهور این قبیل مسائل مخرب و بسیاری مسائل دیگر ضرورت تجدیدنظر در روش های افزایش تولید محصولات و لزوم فراهم سازی شرایط برای استفاده بیشتر از فرآیندهای مفید طبیعی مانند تثبیت زیستی نیتروژن بجای کودهای شیمیایی نیتروژنی را ایجاب می کند.

همانطوری که اشاره شد N_2 برای گیاهان قابل استفاده نیست زیرا برای شکستن پیوند سه گانه $N\equiv N$ انرژی فوق العاده زیادی ($۹/٤٦\times۱۰^{۲}$ کیلوژول به ازاء هر مول) لازم است. در صنعت برای استفاده از مولکول نیتروژن و تهیه آمونیاک معروفترین روش، روش هابر- بوش و طبق فرمول $N_2+3H_2\rightarrow 2NH_3(aq)\Delta G=-53kj$ می باشد. براساس این رابطه با ایجاد درجه حرارتی معادل ٤۰۰ تا ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد و فشاری بیش از ۲۰۰ اتمسفر، مولکول نیتروژن شکسته شده و از طریق پیوند با هیدروژن، مولکول آمونیاک تولید می‌گردد.

تثبیت بیولوژیک نیتروژن در انحصار انواع خاصی از موجودات پروکاریوت می‌باشد که توانائی تولید آنزیم نیتروژناز را دارند. نیتروژناز نقش یک کاتالیزور در احیای N_2 به NH_3 را بر عهده دارد و در دما و فشار معمولی عمل تثبیت نیتروژن را انجام می‌دهد. آمونیم حاصل، در مراحل بعدی به شکل اسیدهای آمینه و سایر ترکیبات نیتروژنی مورد نیاز سلول در می آید و یا در مورد دی‌ازوتروف‌های(تغذیه کنندگان از نیتروژن) همزیست، در اختیار گیاه میزبان قرار می گیرد.

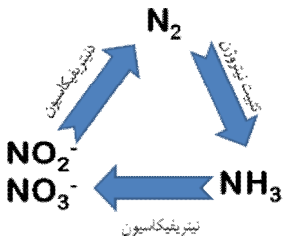
به این ترتیب به یاری دی ازوتروف‌ها این عنصر حیات بخش بطور مداوم به درون سیستم خاک تزریق می شود و ادامه زندگی را برای سایر موجودات امکان پذیر می سازد (دیکسون و ویلر، ۱۹۸٦، استون- سن،۱۹۸۲). فرآیند تثبیت بیولوژیک نیتروژن، نیز فرآیندی است که همواره با مصرف مقداری زیادی انرژی می‌باشد،

لیکن عمل شکستن پیوند سه گانه در مولکول نیتروژن و احیاء بعدی آن در درجه حرارت و فشار معمولی صورت می‌گیرد. ریزجانداران به منظور انجام فرآیند تثبیت نیتروژن مولکولی به آنزیم نیتروژناز، ماده انتقال دهنده الکترون، ماده دهنده الکترون و انرژی به صورت ATP نیازمند می‌باشند (اسپرنت و اسپرنت، ۱۹۹۰).



شکل ۲- تثبیت آنزیمی نیتروژن در ریزجانداران تثبیت کننده نیتروژن

پدیده دی‌ازوتروفی یا توان تغذیه از نیتروژن مولکولی (N_2) به عنوان تنها منبع نیتروژنی، عمل استثنایی و انحصاری گروه خاصی از باکتری‌های خاکزی است که باعث تعادل نیتروژنی در همه اکوسیستم های طبیعی می‌شوند. به جز در مواردی که انسان قادر شود که ژن‌های مسئول عمل تثبیت نیتروژن مولکولی را به موجودات یوکاریوت انتقال دهد با اطمینان می‌توان گفت که هیچ کدام از موجودات تثبیت کننده نیتروژن به طور طبیعی یوکاریوت نمی‌باشند. ریزجاندارانی که توانائی تثبیت نیتروژن را دارند شامل انواع باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و جلبک‌های سبز و آبی می‌باشند که به صورت همزیست و غیر همزیست توانایی ثبیت نیتروژن را دارا هستند. برای سادگی عمل تمامی موجودات دی ازوتروف را باکتری می‌نامیم به جز در یک مورد که پیشوند سیانو (cyano) بکار برده می شود و سیانوباکتری نامیده می شود. (استون- سن،۱۹۸۲).



شکل ۳- چرخه و تثبیت نیتروژن

انواع روش‌های تثبیت نیتروژن با توجه به وابستگی به گیاه

دی ازوتروف ها براساس وابستگی به گیاهان به منظور تأمین کربن و انرژی برای تثبیت نیتروژن به سه گروه: آزادزی، همیار و همزیست تقسیم بندی می‌شوند.

۱- باکتری‌های تثبیت کننده همزیست که در ارتباط نزدیکی با گیاه هستند و با تولید اندام زیستی مشترک با گیاه قادر به تثبیت N_2 می‌باشند.

۲- باکتری‌های تثبیت کننده همیار که تماس فیزیکی ساده با گیاه برقرار نموده ولی اندام زیستی مشترک و قابل مشاهده با گیاه تشکیل نمی‌دهند

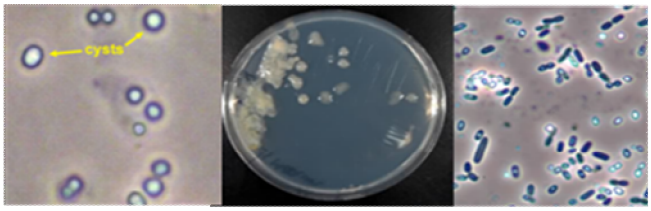
۳- باکتری‌های تثبیت‌کننده آزادزی که بدون نیاز به حمایت گیاه قادر به تثبیت نیتروژن می‌باشند. این موجودات کربن و انرژی لازم برای انجام فرآیند تثبیت نیتروژن را به طور مستقل یعنی بدون همکاری یک گیاه میزبان و اکثراً با روش هتروتروفی یعنی استفاده از مواد کربنی ساده موجود در خاک و یا فتوتروفی و از طریق انجام فتوسنتز فراهم می کنند. این مقاله به طور اجمال مروری بر جایگاه تثبیت کنندگان آزادزی نیتروژن دارد.

شکل ۴- گره ریزوبیومی در لگوم ها

تثبیت نیتروژن توسط هتروتروف‌های آزادزی

این ریزجانداران در فرآیند تثبیت نیتروژن مولکولی از مواد آلی خاک به عنوان منبع انرژی و همچنین به عنوان ماده دهنده الکترون استفاده می‌نمایند و براساس نیاز این میکروارگانسیم‌ها به اکسیژن به سه دسته هوازی، بیهوازی اختیاری، بیهوازی اجباری تقسیم می‌شوند. در نوع هوازی میکروارگانسیم با اکسید کردن مواد آلی و تبدیل آن به آب و دی اکسید کربن، انرژی مورد نیاز برای رشد و انجام فرآیند تثبیت نیتروژن را فراهم می‌نماید. در انواع بیهوازی اجباری ریزجاندار با استفاده از فرآیند تخمیر، مولکول‌های کربوهیدرات را تجزیه و به مولکول-های ساده‌تر تبدیل و از انرژی حاصله استفاده می‌نماید (استون- سن،۱۹۸۲). در انواع بیهوازی اختیاری، ریزجانداران هم در حالت هوازی و هم در حالت غیر هوازی قادر به رشد و تکثیر می‌باشند اما تثبیت نیتروژن مولکولی را در شرایط بی‌هوازی انجام می‌دهند این ریزجانداران در خاک‌های سرشار از مواد آلی و نسبت C/N بالا فعالیت زیادی را از خود نشان می‌دهند اما سهم این ریزجانداران در فرآیند تثبیت نیتروژن مولکولی در مقیاس جهانی ناچیز می‌باشد.

از دی‌ازتوتروف‌های بی‌هوازی اجباری می‌توان به کلستریدیوم و باکتری‌های احیاءکننده گوگردی همانند دسولفویبریو. دسولفوباکتر، دسولفوتوماکولوم و باکتری-های تولید کننده متان اشاره نمود. باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری شامل انواعی از جنس‌های باسیلوس، انتروباکتر و کلبسیلا می‌باشند که تثبیت N_2 را در شرایط میکروآئروبیک (فشار پایین اکسیژن) مثلاً در ناحیه ریزوسفر و داخل ریشه و یا در سطح برگ انجام می‌دهند.از دی‌ازوتروف‌های هوازی که مقاوم به فشار بالای اکسیژن هستند و تثبیت N_2 را در شرایط کاملاً هوازی انجام می‌دهند می‌توان به ازتوباکتر، آزوموناس، بیجرینکیا و درکسیا اشاره نمود. در شکل پنج سلول و کلنی ازتوباکتر به عنوان معروف ترین باکتری این گروه نشان داده شده است.



الف ب ج

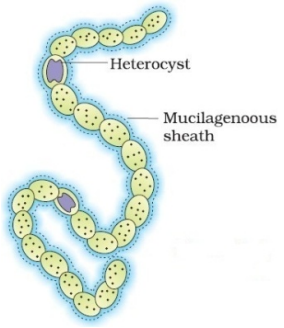
شکل ۵- سلول رویشی ازتوباکتر (الف)کلنی ازتوباکتر (ب) و کیست ازتوباکتر (ج)

تثبیت نیتروژن توسط اتوتروف‌های آزادزی

باکتری‌های دی ازوتروف آزادزی اکثراً از نور به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و جزء فتوتروف‌ها طبقه بندی می شوند. این باکتری‌ها دارای باکتریوکلروفیل هستند و از نوع گرم منفی بوده که خود به دو گروه، شامل سیانوباکتری‌ها یا جلبک های سبز-آبی و باکتری‌های دارای توان فتوسنتز تقسیم می‌شوند. سیانوباکتری‌ها در اکثر محیط‌های آبی نظیر شالیزارها و دریاچه‌های کوچک

با مقادیر متوسط از عناصر غذائی دیده می‌شوند آنها همانند گیاهان عالی مکانیسم فتوسنتزی داشته و دارای فتوسنتز نوع II بوده و O_2 متصاعد می‌کنند. اتوتروف های آزادزی در محیط‌های کم نور و کم اکسیژن هم می‌توانند زنده بمانند به همین دلیل گسترش جغرافیائی وسیعی پیدا کرده‌اند این ریزجانداران به صورت آزادزی یا از طریق برقراری رابطه همزیستی هستند مقدار قابل توجهی نیتروژن مولکولی را تثبیت نمایند.

pH مطلوب برای فعالیت سیانوباکتر حدود خنثی تا نسبتاً قلیائی می‌باشد سیانوباکتری‌ها حاوی کلروفیل نوع a و رنگدانه‌هایی از نوع فیکوبیلین‌ها می‌باشند. سه گروه اصلی سیانوباکتری‌ها شامل انواع تک سلولی، انواع رشته‌ای بدون هتروسیست[۲] و انواع رشته‌ای دارای هتروسیست می‌باشند. هتروسیست‌ها سلول‌های بزرگ با دیواره‌های ضخیم و ظاهراً تو خالی هستند.توانائی تثبیت N_2 بخصوص در سیانوباکتری‌های دارای هتروسیت به فراوانی دیده می‌شود. هتروسیست‌ها با دیوار ضخیم خود، آنزیم نیتروژناز را در مقابل صدمات O_2 محافظت می نمایند. جنس نوستوک نمونه‌ای از انواع رشته‌ای هتروسیست‌دار می‌باشد که توانائی تثبیت نیتروژن را دارد شکل (٦). از انواع رشته‌ای بدون هتروسیست و دارای توان تثبیت نیتروژن می‌توان به جنس‌های پلکتونما[۳]، اسیلاتوریا[٤] و تریکودسمیوم[٥] اشاره نمود (استون- سن،۱۹۸۲).



شکل۶- هتروسیست در نوستوک

1-Heterocysts
2-Plectonema
3-Oscillatoria
4-Trichodesmium

جنس‌های مختلف باکتری‌های دارای توان فتوسنتز متعلق به سه خانواده کلروبیاسه (باکتری‌های سبز گوگردی)، کروماتیاسه (باکتری‌های ارغوانی گوگردی) و رودوسپیریلاسه (باکتری‌های ارغوانی غیر گوگردی) می‌باشند. این باکتری‌ها بر خلاف سایر موجودات فتوسنتز کننده، از آب به عنوان ماده دهنده الکترون استفاده نمی‌کنند و O_2 نیز تولید نمی‌کنند. باکتری‌های گوگردی سبز و ارغوانی از سولفیدهیدروژن به عنوان ماده دهنده الکترون و از دی‌اکسیدکربن به عنوان منبع کربن استفاده می‌نمایند.باکتری‌های غیر گوگردی ارغوانی از مواد آلی به عنوان منبع کربن و ماده دهنده الکترون استفاده می‌نمایند.باکتری‌های گوگردی سبز و ارغوانی اغلب آبزی بوده و در محیط‌های بیهوازی که پتانسیل احیاء، پایین بوده فعال می‌باشند. در حالیکه باکتری‌های غیر گوگردی ارغوانی بی‌هوازی اختیاری می‌باشند و در محیط‌های نیمه‌هوازی یا هوازی می‌توانند به صورت شیمیوارگانوتروف فعالیت نمایند. شرایط مورد نیاز برای فعالیت این باکتری‌ها، وجود نور، مواد آلی، سولفید هیدروژن و فشار پایین اکسیژن می‌باشد (استون- سن،۱۹۸۲).

نقش تثبیت کنندگان آزادزی نیتروژن در اکوسیستم های کره زمین

در بین اکولوژیست ها این تئوری مطرح است که در شکل گیری اکوسیستم های اولیه کره زمین که هنوز گیاهان به وجود نیامده بودند تثبیت کنندگان آزادزی که وابستگی به گیاه نداشته اند نقش مهمی را ایفاء نموده اند.امروزه نیز تثبیت آزادزی در بسیاری از اکوسیستم های کره زمین به عنوان یک منبع نیتروژنی در همه جا حاضر، نقش مهمی را ایفا می کند. این مسئله موجب شده است محققان توجه ویژه ای به مبحث تثبیت نیتروژن از طریق سیستم آزادزی نمایند. میزان تثبیت نیتروژن در باکتری های هوازی غیر فتوسنتزی آزادزی شدیدا به شرایط رطوبتی، غلظت اکسیژن، و تامین سوبسترای کربن بستگی

دارد (ماتیو (۲۰۰۸). همچنین مقادیر مولیبدن، فسفر و نیتروژن خاک نیز از عوامل تعیین کننده مقدار و فعالیت تثبیت آزادزی ذکر شده است (رید و همکاران، ۲۰۰۸).کل نیتروژن تثبیت شده روی زمین در سال در حدود ۲۵۰ میلیو ن تن در سال برآورد شده است.

در حدود ۱۹۵ میلیون تن از این مقدار در سال مربوط به تثبیت زیستی نیتروژن است ۷۰ درصد این مقدار مربوط به سهم تثبیت همزیستی است. اندازه گیری تثبیت نیتروژن در نمونه های کوچک با سوبسترای داده شده مثلا خاک آسان است اما در مقیاس اکوسیستمی که تنوع و فراوانی از نظر زمانی و مکانی زیاد است برآورد نیتروژن تثبیت شده توسط سیستم های آزادزی را محدود می کند.تثبیت آزادزی نیتروژن در بیشتر اکوسیستم های خاکی که سیستم همزیستی وجود ندارد دارای اهمیت قابل توجه است. در اکوسیستم های جنگلی نقش تثبیت کنندگان آزادزی بیشتر از انواع همزیستی است و برآورد شده است که مقدار تثبیت بیشتر از ۱۰ کیلوگرم N در هکتار در سال است.

در مناطق جنگلی به طور کلی تثبیت کنندگان هتروتروف در ناحیه کف جنگل فراوان تر هستند اما در قسمت فوقانی (کانوپی) تثبیت کنندگان آزادزی هتروتروف غالبیت دارند (رید و همکاران، ۲۰۰۸).

نقش تثبیت کنندگان آزادزی در تامین نیتروژن در کشاورزی

گندم، برنج و ذرت سه محصول عمده و اساسی در تغذیه مردم در سراسر دنیا محسوب می شوند. برای تولید یک تن ماده خشک گندم و کلش۲۶ تا ۲۸ کیلوگرم و یک تن برنج و کلش ۱۶ تا ۱۷ کیلوگرم، و برای تولید یک تن ذرت و کلش ۹ تا ۱۱ کیلوگرم N لازم است.بیشتر خاک های کشاورزی دارای کمبود نیتروژن هستند و کود نیتروژنی پرمصرف ترین نهاده در کشاورزی است. معمول ترین و پرمصرف ترین کود برای تامین نیتروژن کود اوره است. متاسفانه کارآیی اوره پایین بوده و کمتر از ۵۰ درصد این کود توسط گیاه جذب می شود و عمدتا به دلایل تبخیر و تصعید، دنیتریفیکاسیون و آبشویی از دسترس گیاه خارج می شود. مسئله به همین جا ختم نمی‌شود زیرا تبخیر و تصعید و دنیتریفیکاسیون اوره از طریق تولید گازهای گلخانه ای N_2O، NO و NH_3 موجب مشکلات زیست محیطی می شوند همچنین از دست رفتن نیتروژن توسط آبشویی موجب آلودگی آبهای زیرزمینی می شود.

این مسائل دانشمندان را بر آن داشته است تا به فکر جایگزین های مناسب برای تامین نیتروژن مورد نیاز محصولات کشاورزی باشند. در این میان استفاده از فناوری تثبیت بیولوژیک نیتروژن بیش از همه مورد توجه قرار گرفته است. امیدواری ها در مورد سیستم‌های همزیستی همانند همزیستی لگوم-ریزوبیوم بسیار بیشتر از سیستم آزادزی بویژه انواع هتروتروف در رابطه با تامین نیتروژن می باشد.

تحقیقات مختلف محققین نشان می دهد نقش انواع باکتری های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن در رشد گیاه عمدتا به واسطه تولید هورمون های محرک رشد همانند اکسین ها، جیبرلین ها، سیتوکینین ها و اتیلن، توان حل کنندگی فسفات ها، افزایش جذب عناصر، افزایش مقاومت به تنش ها، تولید ویتامین ها و بیوکنترل عوامل بیماریزای گیاهی می باشد (کندی و همکاران، ۲۰۰۴).

بنابراین پژوهش‌ها در رابطه با مایه تلقیح های حاوی باکتری های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن برای غیر لگوم ها و از جمله غلات تاکنون نتوانسته است همانند ریزوبیوم‌ها در لگوم ها به عنوان جایگزین مطمئنی برای کود شیمیایی نیتروژنی باشد. با اینحال تلاش ها در این زمینه توسط محققین همچنان ادامه دارد.

پژوهش‌های انجام شده در رابطه با نقش تثبیت کنندگان آزادزی نیتروژن در کشاورزی جهان

اولین دی ازوتروف آزادزی به نام ازتوباکتر در سال ۱۹۰۱ از خاک جداسازی و شناسایی شد (تامسون و

اسکرمن،۱۹۷۹). آزمایشهایی در بین سال‌های ۶۰-۱۹۵۸ برای تعیین و ارزیابی چگونگی واکنش گیاهان به مواد تلقیحی ازتوباکتر در شرایط مزرعه در اتحاد جماهیر شوروی سابق انجام شد در ۸ آزمایش از کل ۲۳ آزمایش مزرعه‌ای، عملکرد گیاه به طور محسوسی افزایش نشان داد که خود حاکی از تاثیر مثبت و مطلوب تلقیح بود.بیشتر آزمایشات اولیه در روسیه، اروپای شرقی و هندوستان انجام شده است که فقط یک سوم از آزمایشات منجر به افزایش محصول و حداکثر تا ۳۹ درصد شد.

روهاتاشاو-سینگ و همکاران (۱۹۹۳)، افزایش وزن خشک ذرت در اثر تلقیح با باکتری ازتوباکتر را گزارش دادند. عملکرد و جذب نیتروژن گندم پاییزه در اثر تلقیح با باکتری‌های ریزوسفر از جمله ازتوباکتر کروکوکوم قابل توجه ذکر شده است (رناتودفریتاس، ۲۰۰۰). سویه‌های مختلف باسیلوس توانستند از طریق تثبیت نیتروژن و انحلال فسفات‌های نامحلول، رشد جو را افزایش دهند. (مصطفی و همکاران، ۲۰۰۵). رای و گاور (۱۹۸۸) اثر ازتوباکتر و آزوسپیریلوم را بر رشد و عملکرد گندم بررسی کردند بطویکه ازتوباکتر به تنهایی ۸/۲، آزوسپیریلوم ۹/۱ و مخلوط این دو ۱۳/۹ درصد افزایش عملکرد را نسبت به شاهد بدون تلقیح موجب شد.

تیلاک و همکاران (۱۹۸۲) اثر تلقیح ازتوباکتر و آزوسپیریلوم را بر مقدار ماده خشک بخش هوایی ذرت و سورگوم قابل توجه ذکر کرده اند. اثرات مثبت تلقیح توام ازتوباکتر و ریزوبیوم بر گره‌بندی سویا، ماش و شبدر معنی دار گزارش شده است (بورنز و همکاران، ۱۹۸۱).اثر تلقیح توام ازتوباکتر و ریزوبیوم بر موفقیت تلقیح و عملکرد باقلا و جذب عناصر معدنی توسط آن مثبت گزارش شده است (رودلاس، ۱۹۹۹). اثر ازتوباکتر کروکوکوم در حل کردن فسفات‌های غیر آلی و افزایش رشد گندم بدین واسطه گزارش شده است (کومار و نیرو-نارولا، ۱۹۹۹).

جرک و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که در اثر تلقیح گندم بوسیله ازتوباکتر ۱۱-۸ درصد عملکرد آن افزایش یافت. در هندوستان آزمایشهای مزرعه‌ای با استفاده از مایه تلقیح ازتوباکتر برروی بذر و نشاء گیاهانی مانند گندم، برنج، پیاز، نیشکر، گوجه‌فرنگی، ذرت، سیب زمینی، جو، یولاف، کلم و بادمجان در شرایط مختلف آب و هوایی انجام شده است. نتیجه افزایش عملکرد در همه محصولات بین ۱۲-۷ درصد نشان داد که این افزایش عملکرد به دلیل تثبیت نیتروژن مولکولی بوده است اما سنتز اکسین، ویتامین و هورمونهای محرک رشد و مواد ضد قارچی نیز اثر مفیدی بر رشد و جوانه‌زنی گیاهان داشته است (سوباراو,۱۹۸۸).

در آزمایشی تاثیر تلقیح با ازتوباکتر و میکوریز درونی (*Glomus fasciculatum*) بر فاکتورهای مختلف رشد در گیاه گوجه فرنگی بررسی شد. نتایج نشان داد که تلقیح با ازتوباکتر یا میکوریز درونی شاخص سطح برگ، وزن خشک اندام هوایی، میزان فسفر و نیتروژن برگ‌ها و در نتیجه میزان محصول نسبت به تیمار شاهد که هیچ تلقیحی روی آن انجام نگرفته بود افزایش داد (مهنداس، ۱۹۸۷).

مانسک و همکاران (۱۹۹۵) بذرهای مختلف گندم را با سویه‌های مختلف ازتوباکترکروکوکوم تلقیح نمودند نتایج نشان داد که ازتوباکتر با تولید انواع هورمون-های گیاهی، رشد طولی و تراکم رشد ریشه‌های گندم را افزایش داده و میزان آلودگی ریشه‌های گندم را به میکوریز در همه رقم‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. این مساله باعث شد تا راندمان مصرف نیتروژن و فسفر بهبود یافته و میزان محصول (دانه) افزایش یابد. همچنین تاثیر سویه‌های مختلف ازتوباکتر و میکوریز درونی برروی جوانه‌زنی و ریشه‌زایی سیب در شرایط گلخانه‌ای بررسی و نتیجه گرفته شد که تیمارهایی که با ازتوباکتر کروکوکوم تلقیح شده بودند.

علاوه بر اینکه از درصد جوانه زنی بالاتری برخوردار بودند دارای میزان کلروفیل بالاتر و شاخص سطح برگ بیشتری بودند (شارما و بوتانی، ۱۹۹۸). در آزمایش دیگری اثر باکتری ازتوباکتر به عنوان باکتری

محرک رشد به همراه مواد آلی برروی گیاه ذرت بررسی شد آزمایش در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار طراحی شده بود و نتیجه آزمایش این مساله را نشان داد که تلقیح خاک با ازتوباکتر و مواد آلی، قابلیت جذب نیتروژن و فسفر را به بالاترین حد خود رسانده و میزان محصول ذرت نیز به میزان قابل توجهی افزایش یافته بود (هنساودین ،۲۰۰۳).

پژوهش‌های انجام شده در رابطه با ریزجانداران آزادزی در کشاورزی ایران

خسروی و همکاران (۱۳۷۷) اثر تلقیح باکتری-های بومی ازتوباکتر کروکوکوم را بر رشد گندم و افزایش سیستم ریشه‌ای آن در یک آزمون گلخانه‌ای معنی‌دار گزارش دادند. ملکوتی و همکاران، ۱۳۸۳در یک طرح تحقیقی- ترویجی اثر مایه‌تلقیح ازتوباکتر بر رشد گندم آبی و دیم در سطح ۵۰۰ مزرعه مربوط به کشاورزان استان‌های فارس، خراسان، قم و اصفهان بررسی کردند.نتایج مشاهده‌ای حاکی از اثر مثبت تلقیح بر رشد گندم در برخی از مزارع بود. در این بررسی افزایش رشد رویشی، سطح برگ و شادابی مزارعی که با ازتوباکتر تلقیح شده بودند حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد گزارش شده است.

رجایی و همکاران (۱۳۸٦) گزارش دادند که تلقیح گندم با برخی از سویه‌های بومی ازتوباکتر کروکوکوم موجب افزایش شاخص‌های مختلف رشد در شرایط گلخانه‌ای شدند. خسروی و همکاران (۲۰۰۹) در آزمایشی اثر تلقیح ریشه نهال سیب با چند سویه ازتوباکتر بومی بر جذب عناصر و برخی شاخص‌های رشد را بررسی کردند. نتایج نشان داد که تلقیح، جذب پتاسیم، منیزیم، آهن، منگنز، روی و بر توسط برگ‌ها و همچنین مقادیر جذب نیتروژن، فسفر، پتاسیم، منگنز و روی توسط ریشه‌ها را افزایش داد.

خسروی و همکاران (۱۳۸۸) پس از جداسازی ۲۱۷ سویه ازتوباکتر کروکوکوم از ۳٦۲ نمونه خاک از مزارع زیر کشت گندم در ایران و اثر تلقیح سویه‌های برتر بر رشد گندم در مناطق مختلف نتایج متفاوتی را گزارش دادند. در این پژوهش عملکرد دانه گندم نسبت به شاهد بدون تلقیح در مناطق مختلف بین صفر تا بیست درصد افزایش نشان داد.

خسروی و محمودی (۱۳۹۲) سه نوع مایه تلقیح ازتوباکتر به همرا کود دامی را بر رشد گندم دیم در ایستگاه تحقیقات صحرایی دیم مراغه مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که عمکلرد دانه، وزن خشک اندام هوایی، جذب عناصر نیتروژن، فسفر و روی دانه افزایش معنی داری در اثر تلقیح حاصل شد. لازم به ذکر است که تلقیح همیشه و در همه شرایط با نتایج مثبت همراه نیست.خسروی (۱۳۹۲) با بررسی اثر یک نوع مایه تلقیح ازتوباکتر تجاری تولید داخل بر رشد گندم در هشت نقطه ایران گزارش دادند که تلقیح هیچ اثر مثبتی بر رشد گندم نداشته است. خسروی (۱۳۹۱) با بررسی اثر یک نوع مایه تلقیح ازتوباکتر تجاری تولید داخل بر رشد ذرت در ۱۰ نقطه ایران گزارش دادند که تلقیح هیچ اثر مثبتی بر رشد این محصول نداشته است.

حامل های مناسب برای تهیه مایه تلقیح باکتری‌های آزادزی

حامل در مایه تلقیح ها و کودهای زیستی عبارت ماده یا ترکیبی از مواد مختلف است که بتواند ریزجاندار یا ریزجانداران مورد نظر را در یک جمعیت معین به دست مصرف کننده برساند. بر این اساس حامل می بایستی شرایط تنفسی، اسیدیته، میزان رطوبت و سایر شراط برای رشد ریزجاندار را در طول مدت از تولید تا مصرف را فراهم نماید. از رایج ترین مواد حامل یا نگهدارنده طبیعی برای تولید مایه تلقیح، انواع خاصی از تورب یا پیت است. البته همه تورب‌ها برای این منظور مناسب نیستند و توصیه شده که تورب یا هر نوع ماده حامل دیگر، قبل از تولید انبوه از نظر توان نگهداری باکتری در سطحی مناسب که از نظر کمی و کیفی با

استانداردهای لازم تعیین شده است دقیقاً مورد بررسی قرار گیرد. به دلیل فقدان تورب مناسب در غالب کشورها، مواد گوناگونی به عنوان جایگزین آن مورد آزمایش قرار گرفته اند که به صورت یک یا مخلوطی از چند ماده مربوط به گروه های زیر قابل تقسیم بندی هستند:

۱) کمپوست مواد گیاهی: برگ خرما، الیاف نارگیل، خاک اره، چوب بلال ذرت، سبوس و کاه گندم، پوسته برنج، آرد حبوبات و ملاس نیشکر

۲) مواد کربنی: زغال چوب، زغال سنگ، لیگنیت و سایر موارد مشابه.

٤) مواد معدنی: ورمی کولیت، پرلیت، بنتونیت، ماسه، سولفات کلسیم.

۳) برخی روغن های معدنی یا گیاهی: آلژینیت، ژل پلی آکریل‌آمید

در حال حاضر در ایران پرلیت به عنوان یک ماده معدنی قابل دسترس و ارزان رواج بیشتری به عنوان حامل برای تهیه مایه تلقیح باکتری‌های آزادزی دارد.

مقدار و نحوه مصرف مایه تلقیح‌های حاوی باکتری‌های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن

مقدار و نحوه مصرف مایه تلقیح‌های حاوی باکتری‌های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن در گزارشات مختلف، متفاوت است. به عنوان مثال در مقالات پژوهشی مقدار توصیه شده با انواع تجاری متفاوت است. در طرح های پژوهشی جمعیت باکتری‌ها معمولا به صورت تعداد باکتری در میلی‌لیتر یا گرم مایه تلقیح به ازای هر بذر یا نهال یا نشاء گزارش می شود. در انواع تجاری بر حسب کیلوگرم یا گرم برای انواع مایه تلقیح جامد و میلی لیتر یا لیتر برای انواع مایه تلقیح مایع توصیه می شود. در مقالات منتشر شده از پژوهش‌هایی که در رابطه با ازتوباکتر در ایران انجام شده است مقدار مایه تلقیح مصرفی به صورت جدول (۱) می باشد. مایه تلقیح حاوی باکتری‌های آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن برای تلقیح محصولات مختلف برای انواع تجاری تولید شده در ایران به شرح جدول(۲) است.

جدول ۱ - مقدار مایه تلقیح ازتوباکتر برای تلقیح محصولات مختلف

گیاه هدف	جمعیت در مایه تلقیح	مقدار مصرف	نحوه مصرف	منبع
گندم (گلخانه)	10^8 سلول در میلی لیتر	یک میلی لیتر به ازاء هر بذر	تلقیح بذری	خسروی، ۱۳۷۷
گندم دیم	10^8 سلول در گرم	۳۰ گرم در ۵۰ متر مربع	تلقیح بذری	خسروی و محمودی، ۱۳۹۲
گندم آبی	10^8 سلول در میلی لیتر	۳۰ گرم در ۶۰ متر مربع	تلقیح بذری	خسروی، ۱۳۸۸
نهال سیب	10^7 سلول در میلی لیتر	۵۰ میلی‌لیتر به ازاء هر نهال	خاک و نهال	خسروی و همکاران،۲۰۰۹
گندم	10^6 سلول در میلی لیتر	۲۵ میلی لیتر در ۵ متر مربع یا ۳۰۰ گرم بذر	خاک و بذر	جرک و همکاران، ۲۰۰۶
گندم	10^8 سلول در میلی لیتر	حدود ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری	بذری	میلوشویچ و همکاران،۲۰۱۲

جدول۲- مقدار و نوع باکتری‌های آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن برای تلقیح محصولات مختلف برای انواع مایه تلقیح تجاری در ایران

نام تجاری کود	محصول هدف	نوع باکتری	جمعیت مورد ادعا	مقدار مصرف	نحوه مصرف
نیتروکارا	غلات و حبوبات، سبزی و صیفی	آزوریزوبیوم	10^7 سلول در گرم	۱۰۰-۱۰ گرم برای ۱۰۰گرم بذر	تلقیح بذری
نیتروکارا	درختان میوه	آزوریزوبیوم	10^7 سلول در گرم	۴-۲ گرم برای هر درخت	اطراف ریشه
نیتراژین	گندم و جو	ازتوباکتر+ آزوسپیریلوم	10^8 سلول در میلی لیتر	۴-۲ لیتر	تلقیح بذری
بیوفارم	گندم و جو	ازتوباکتر+ آزوسپیریلوم+ سودوموناس	10^8 سلول در میلی لیتر	۲-۱ لیتر در ۱۰۰ کیلوگرم بذر	تلقیح بذری
سوپر نیتروپلاس	غلات، حبوبات، سبزی، صیفی	آزوسپیریلوم+ سودوموناس+ باسیلوس	10^8 سلول در میلی لیتر	۴-۲ لیتر در هکتار	تلقیح بذری
کارا	غلات، حبوبات، سبزی، صیفی	ازتوباکتر+ آزوسپیریلوم	10^{10} سلول در گرم	۳۰۰ گرم برای هر ۳۰۰ گرم بذر	تلقیح بذری
نیتروکسین	غلات، سبزی، صیفی	ازتوباکتر+ آزوسپیریلوم	10^7 سلول در میلی لیتر	۴-۲ لیتر برای مقدار بذر توصیه شده	تلقیح بذری
رشد افزا	محصولات مختلف	آزوسپیریلوم+ سودوموناس+ باسیلوس	10^7 سلول در میلی لیتر	۲ لیتر برای هر هکتار	محلول پاشی

جدول ۳- مقدار و نحوه مصرف مایه تلقیح‌های تجاری در هندوستان

گیاه هدف	ریزجاندار	مقدار	نحوه‌مصرف
گندم، جو، چاودار	ازتوباکتر+ آزوسپیریلوم	۵۰۰ میلی‌لیتر در هکتار	بذری
برنج	آزوسپیریلوم	۵۰۰ میلی‌لیتر در هکتار	بذری
دانه‌های روغنی (خردل، کنجد، آفتابگردان، کرچک)	ازتوباکتر	۵۰۰ میلی‌لیتر در هکتار	بذری
ارزن	ازتوباکتر	۵۰۰ میلی‌لیتر در هکتار	بذری
سورگوم و ذرت	آزوسپیریلوم	۵۰۰ میلی‌لیتر در هکتار	بذری

مقدار و نحوه مصرف مایه تلقیح‌های ازتوباکتر و آزروسپیریلوم برای ا نواع تجاری در کشور هندوستان در جدول (۳) آمده است.

برخی مشکلات و چالش‌های پیش روی توسعه کودهای زیستی حاوی تثبیت کنندگان آزادزی نیتروژن:

۱. متمرکز نبودن پژوهش های مرتبط با تثبیت کنندگان آزادزی نیتروژن

۲. عدم انجام عمده پژوهشها در مزرعه و بویژه مزارع زارعین

۳. تعداد اندک اجرای مزارع تحقیقی- ترویجی (اکثر تحقیقات مزرعه‌ای به صورت تیمار-تکرار است).

٤. وجود استراتژاهای متفاوت در مدیریت زراعی در مزارع مختلف

۵. قیمت کم کودهای شیمیایی و هدفمند نبودن یارانه کود

چشم انداز آینده تثبیت کنندگان آزادزی نیتروژن امیدها به انقلاب سبزی دیگر در کشاورزی

بعد از کشف رابطه همزیستی تثبیت نیتروژن بین ریزوبیوم‌ها و لگوم‌ها دانشمندان به دنبال این مسئله بوده

اند که آیا امکان برقراری رابطه همزیستی بین تثبیت کنندگان نیتروژن و محصولات مهمی همچون غلات وجود دارد. پاسخ به این سوال یا ایجاد چنان امکانی می-تواند به عنوان یک تحول خیره کننده در کشاورزی محسوب شود. امیدها در این زمینه با سویه هایی از ریزوبیوم که قادرند علاوه بر لگوم ها گیاهان غیر لگوم همانند پاراسپونیا را نیز آلوده کنند بیشتر شده است.

نمونه دیگر رابطه همزیستی بین اکتینومیست فرانکیا و درخت توسکا همچنین رابطه همیاری اختصاصی تثبیت نیتروژن بین ازتوباکتر پاسپالی با گیاه پاسپالوم است. این موضوعات دانشمندان را به فکر امکان استفاده از تثبیت کنندگان نیتروژن برای ایجاد رابطه همزیستی با گیاهان غیر لگوم مهمی همچون گروه غلات نموده است. رایج و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از 2,4,D و تلقیح باکتری‌های مختلف توانستند ساختمان های گره مانندی در گندم ایجاد نمایند.

عبدالهادی و همکاران (۲۰۱۳) نیز با استفاده از ازتوباکتر کروکوکوم و یک سری از ترکیبات شیمیایی توانسته اند شبه گره های در گندم ایجاد نمایند. بیوتی و گود (۲۰۱۱) در هفته نامه شماره ۳۳۳ انجمن پیشرفت علوم آمریکا در مقاله‌ای با عنوان چشم انداز آینده برای غلاتی که نیتروژن تثبیت می کنند به این موضوع تاکید کرده و حتی راهکار انتقال ژن تثبیت نیتروژن به غلات را پیشنهاد داده است. با اینحال تحقیقات در این زمینه ادامه دارد و چنانچه موفقیت نهایی در این زمینه حاصل شود با توجه به اهمیت و جایگاه غلات و از جمله گندم به اعتقادنگارنده می توان آن را به عنوان انقلاب سبز دیگری در کشاورزی نامید.

پیشنهادها برای توسعه پژوهش و کاربرد کودهای زیستی حاوی تثبیت کنندگان

۱-ایجاد سیستم ارزش گزاری محصولات کشاورزی بر اساس کیفیت محصول و اولویت خرید تضمینی با محصولات ارگانیک

۲-تاکید رسانه های ارتباط جمعی بر ضرر زیادی نیترات برای سلامتی انسان و لزوم مصرف محصولات ارگانیک

۳-ایجاد مرکز مطالعات کودهای زیستی برای متمرکز نمودن پژوهش‌های مربوط به تثبیت کنندگان نیتروژن.

٤-انجام تحقیقات بنیادی در رابطه با باکتری‌های بومی تثبیت کننده نیتروژن و تمرکز بر تحقیقات مرتبط با همزیستی تثبیت کنندگان نیتروژن در گیاهان غیر لگوم بویژه غلات و انجام پژوهش‌های در زمینه بیوتکنولوژی این ریز جانداران و گیاهان مورد مطالعه.

۵-هدفمند نمودن یارانه کودهای شیمیایی و اختصاص بخشی از یارانه کود به امر پژوهش، ترویج و تولید مایه تلقیح‌های حاوی ریزجانداران تثبیت کننده نیتروژن.

فهرست منابع

۱. خسروی ه. ۱۳۸۸. دستیابی به دانش فنی تولید کود بیولوژیک حاوی باکتری‌های ازتوباکتر برای مزارع گندم. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، نشریه شماره ۱٤۵۰.

۲. خسروی ه.، ن. صالح راستین و م. محمدی. ۱۳۷۷. اثر تلقیح ازتوباکتر کروکوکوم به عنوان یک کود بیولوژیک بر رشد و عملکرد گندم. مجله خاک و آب، ۱۲(۵): ۸-۱.

۳. خسروی، ه. ۱۳۹۱. بررسی اثر بخشی مایه تلقیح BBP1 بر رشد و عملکرد ذرت به عنوان گیاه شاخص در مناطق مختلف ایران. مؤسسه تحقیقات خاک و آب، نشریه شماره ۱۷٤۳.

٤. خسروی، ه. ۱۳۹۲. بررسی اثر بخشی مایه تلقیح ازتوباکتر بر رشد و عملکرد گندم در مناطق مختلف ایران. مؤسسه تحقیقات خاک و آب. نشریه شماره ۱۷۹۳.

۵. خسروی ه. و ح. محمودی ۱۳۹۲. بررسی اثرات مایه تلقیح ازتوباکتر به همراه کود دامی بر رشد گندم دیم. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۳(۲): ۲۱۹-۲۰۵.

٦. رجایی، س.، ح. علیخانی و ف. رئیسی. ۱۳۸٦. اثر پتانسیل محرک رشد سویه های بومی ازتوباکتر کروکوکوم روی رشد، عملکرد و جذب عناصر غذایی گندم. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ٤١: ٢٩٦-٢٨٥.

۷. خسروی ه. و ح. محمدی. ۱۳۹۲. بررسی اثرات مایه تلقیح ازتوباکتر به همراه کود دامی بر رشد گندم دیم. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۳(۲): ۲۱۹-۲۰۵.

۸. ملکوتی، م.ج.؛ ف. رجالی؛ ک. خاوازی؛ ز. خوگر، ع.ا. شهابی؛ پ. کشاورز؛ ر. وکیل. ۱۳۸۳. بررسی نقش مایه‌تلقیح ازتوباکتر (PGPR) در افزایش عملکرد گندم آبی و دیم در چند استان کشور، صفحات ١٦٧-١٥٩ از کتاب مجموعه مقالات "روش‌های نوین تغذیه گندم" ملکوتی و همکاران. وزارت جهاد کشاورزی، دفتر طرح خودکفایی گندم،۸۵۱ صفحه.

9. Abd Al-Hadi H.S, M. A. Abd Al- Rahman, A. M. G. Zedan and S. F. M. El-Hafnawy.2013. Effect of chemical mutagens on some bacteria and fungi strains to induce Para-Nodules in wheat plant. Alex. J. Agric. Res. 58(3): 209-217.
10. Burns, T.A., P.E. Bishop and W. Daniel. 1981.Enhancement nodulation of leguminous plant roots by mixed cultures of *Azotobacter vinelandii* and Rhizobium. Plant and Soil, 62: 399-412.
11. Beauty, P.H., and A.G., Good. 2011. Future prospects for cereals that fix nitrogen. Science 333, 416. DOI: 10.1126/science. 1209467.
12. Dixon, R. O. D., and C. T. Wheeler, 1986. Nitrogen Fixation in Plants. Chapman and Hall, New York.
13. Hasanudin, H. (2003). Increasing of the nutrient and uptake availability of N and P and through corn yield of inoculation of Mycorrhiza and Azotobacter on ultisol organic matter. Journal of Agriculture Sciences of Indonesia, 5(1): 83 – 89.
14. Jarak, M., R. Protio, S. Jankovio and J. Colo. 2006. Response of wheat to Azotobacter-Actinomycet inoculation and nitrogen fertilizers. Romanian Agriculture Research. 23: 37-41.
15. Kennedy, I. R., A.T.M.A. Choudhury and M.L. Kecske´s. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems:can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biology & Biochemistry, 36: 1229–1244.
16. Khosravi, H., S. M. Samar, E. Fallahi, H. Davoodi, M. Shahabian. 2009. Inoculation of 'Golden Delicious' Apple trees on M9 rootstock with Azotobacter improves nutrient uptake and growth indices. Journal of Plant Nutrition, 32: 946–953.
17. Kumar, V. and N. Narula. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biol. Fertil. Soils, 28: 201-305.
18. Matthew, C.J., M.K. Bjorkman, M.K. David, A.M. Saito and P.J. Zehr. 2008. Regional distributions of nitrogen-fixing bacteria in the Pacific Ocean. Limnol. Oceanogr, 53: 63-77.
19. Manske, G.G.B., A.B. Luttger, R.K. Behl and P.L.G. Vlek, 1995. Nutrient efficiency based on VA mycorrhiza (VAM) and total root length of wheat cultivars grown in India. Angew. Bot., 69: 108-110.

20. Mohandas S. 1987. Field response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. 'Pusa mycorrhizal fungi and rhizobium and their influence. In Mycorrhizae: biofertilizers National Conference on Mycorrhiza, pp: 212-215.
21. Mustafa, Y., and S.B. Canbolat. 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. Biology and Fertility of Soils, 42(4): 350-357.
22. Reed, C.S., C.C. Cleaveland and A.R. Towsend. 2011. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.42:489-512.
23. Renato de Freitas, J. 2000. Yield and N assimilation of winter inoculated wheat rhizobacteria. Pedobiologia, 44: 97-104.
24. Rai, S. N. and A. C. Gaur. 1988. Characterization of *Azotobacter spp.* and effect of Azotobacter and Azospirillum as inoculants on the yield and N-uptake of wheat crop. Plant and Soil, 109: 131-134.
25. Ridge R.W., G.L. Bender and B.G. Rolfe. 1992. Nodule-like structures induced on the roots of wheat seedlings by the addition of the synthetic auxin 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid and the effects of microorganisms. Australian Journal of Plant Physiology, 19(5): 481-492.
26. Rohitashav-Singh, B.K., Sood, V.K. Sharma, and R. singh.1993. Response of forage maize (*Zea mays* L.) to Azotobacter inoculation and nitrogen. Indian Journal of Agronomy, 38:555-558.
27. Rodelas, B. 1999. Influence of Rhizobium /Azotobacter combined inoculation on mineral composition of faba bean (*vicia faba*). Biology and Fertility of Soils, 29 (2): 165-169.
28. Sharma, S.D. and V.P. Bhutani. 1998. Response of apple seedlings to VAM, Azotobacter and inorganic fertilizers. Horticulture J., 11(1): 1-8.
29. Sprent, J. I. & P. Sprent.1990. Nitrogen fixing organisms: Pure and Applied Aspects, 2nd eds. London & New York: Chapman and Hall.
30. Steven- son, F. J. 1982. Nitrogen in agricultural soils. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin U.S.A., 940 p.
31. Suba Rao, N.S. 1988. Biofertilizers in agriculture. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, 208 p.
32. Thompson, J. P. and V.B.D. Skerman. 1979. Azotobacteraceae: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria. Academic press, London
33. Tilak, K.V.BR., C.S. Singh, N.K. Roy and N.S. Subba Rao. 1982. *Azospirillum brasilense* and Azotobacter inoculums effect on maize and sorghum. Soil Biology and Biochemistry, 14: 417-418.