ازتوباکتر و نقش آن در مدیریت حاصخیزی خاک

هوشنگ خسروی[۱]

عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات خاک و آب.

hkhosravi@swri.ir

*دریافت: شهریور ۱۳۹۳ و پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

چکیده

ازتوباکتر باکتری گرم منفی، هوازی، شیمیوارگانوتروف در اشکال میله‌ای، کروی و بیضوی می باشد. این باکتری متعلق به رده گاما-پروتئوباکتری‌ها و خانواده سودوموناداسه بوده و هفت گونه دارد. ازتوباکتر فاقد توان اسپورزایی است ولی معمولاً تشکیل کیست می‌دهد. گونه‌های مختلف ازتوباکتر از مناطق بسیار گرم و حاره تا مناطق قطبی و در محدوده pH ۳ تا ۹یافت می‌شوند. با اینحال عمدتاً در خاک‌های خنثی تا قلیائی یافت می‌شوند. ازتوباکتر قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی به صورت غیر همزیست می‌باشد. این باکتری می‌تواند انواع اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و هورمون‌های محرک رشد گیاه و انواع اگزوپلی‌ساکاریدها را سنتز کند. تعداد ازتوباکتر در خاک معمولا کمتر از $۱۰^{۴}$ است. میانگین تعداد ازتوباکتر در برخی خاک‌های کشاورزی ایران $۱/۵\times۱۰^{۳}$ سلول در هر گرم خاک گزارش شده است. نقش ازتوباکتر در رشد گیاه به واسطه تولید هورمون‌های محرک رشد، توان حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول، افزایش جذب عناصر، تثبیت نیتروژن، افزایش مقاومت به تنش‌ها و بیوکنترل عوامل بیماریزای گیاهی می‌باشد. برخی سویه‌های ازتوباکتر پتانسیل خود را در زیست پالایی اراضی آلوده نشان داده‌اند. نتایج معنی‌داری در مورد اثر تلقیح ازتوباکتر بر رشد محصولات مختلف از جمله غلات، سبزی‌جات و درختان مثمر بدست آمده است. نیاز ازتوباکتر به مواد کربنی ساده و کمبود مواد آلی در بسیاری از خاک‌های کشاورزی، عدم قطعیت در تکرارپذیری و اثربخشی مایه تلقیح ازتوباکتر و عدم توان رقابت با کودهای شیمیایی در افزایش عملکرد محصول از مهمترین دلایل رونق کمتر استفاده تجاری از مایه تلقیح ازتوباکتر است. با اینحال توان ماندگاری طولانی مدت ازتوباکتر در خاک و بسته‌های مایه تلقیح و قابلیت کاربرد آن برای محصولات مختلف از مهمترین مزیت‌های نسبی ازتوباکتر است. تجمیع صفات مختلف محرک رشد در یک سویه و پژوهش در مورد ایجاد توان برقراری رابطه همزیستی ازتوباکتر با گیاهان مهم کشاورزی از جمله غلات از طریق بررسی‌های مولکولی از مهمترین پیشنهادات برای ادامه پژوهش‌ها در این مورد می‌باشد.

واژه های کلیدی: تثبیت نیتروژن، محرک رشد، کود زیستی.

---

۱ - آدرس نویسنده مسئول: کرج، مشکین دشت، بلوار امام خمینی (ره)، مؤسسه تحقیقات خاک و آب

مقدمه

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 بویژه کربن، نیتروژن، فسفر و گوگرد توسط ریزجانداران خاک انجام می-شود.حاصل مطالعات در میکروبیولوژی خاک نه فقط شناخت پدیده‌های مختلف بلکه بهره‌گیری از این توان-مندی‌ها در جهت تولید فرآورده‌های زیستی از جمله تولید کودهای زیستی برای محصولات مختلف، استفاده از ریزجانداران در زیست‌پالایی و رفع آلودگی‌های زیست محیطی از منابع خاک و آب، مقابله با تنش ها از قبیل خشکی، شوری و استفاده از آنها برای تأمین سلامت گیاه است.

دانش میکروبیولوژی خاک آنچنان گسترش یافته که مجال پرداختن به فقط عناوین آن نیز در این مقاله امکانپذیر نخواهد بود. لذا ناگزیر باید مستقیما و با توضیحاتی مختصر به مطلب اصلی پرداخت. باکتری‌ها، عمده‌ترین و مهمترین گروه ریزجانداران خاک محسوب می‌شوند. در بیش از یک قرن پیش اولین باکتری تثبیت کننده نیتروژن همزیست با لگوم‌ها و اولین باکتری آزادزی کشف و به ترتیب ریزوبیوم و ازتوباکتر نامگذاری شدند.ازتوباکتر از باکتری‌های مهم و مفید خاک است که در بسیاری از اکوسیستم‌ها و اقلیم‌های کره زمین و در اراضی کشاورزی و منابع طبیعی و در زیست‌گاه‌هایی مانند خاک، آب و گیاه در مناطق مختلف از گرمسیری تا قطبی و در محدوده وسیع پ‌هاش یافت می‌شود. از بارزترین خصوصیات این باکتری توان تثبیت نیتروژن مولکولی و تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه است. در این مقاله به طور اجمال به برخی از مهمترین خصوصیات مرفولوژیک، اکولوژیک و فیزیولوژیک ازتوباکتر و نقش آن در کشاورزی و منابع طبیعی پرداخته خواهد شد.

طبقه‌بندی[1] و تاریخچه ازتوباکتر

جنس ازتوباکتر برای اولین بار در سال ۱۹۰۱ توسط مارتینوس بیجرینک[2] میکروبیولوژیست هلندی و از بنیانگذاران میکروبیولوژی محیطی شناسائی شد. ایشان اولین گونه را کروکوکوم[3] نامید. در سال ۱۹۰۹ لیپمان گونه وینلاندی و یکسال بعد گونه سوم شناسایی و به افتخار بیجرینک ازتوباکتر بیجرینکی نامیده شد. در سال ۱۹٤۹ نیکولای کراسیلنیکوف، میکروبیولوژیست روسی گونه نیگریکانس را شناسایی و نامگذاری کرد.

تامسون و اسکرمن (۱۹۸۱) گونه آرمنیاکوس را معرفی نمودند. پیج و شیوپراساد (۱۹۹۱) گونه سالینستریس را جداسازی و معرفی نمودند. در سال‌های بعد بعضی از جنس‌ها و گونه‌ها از خانواده ازتوباکتراسه تفکیک شدند (تامسون و اسکرمن،۱۹۷۹). اصول کلی استفاده شده در طبقه‌بندی ازتوباکتر شامل داشتن تاژک، تولید رنگیزه, تولید کیست و خصوصیات ژنتیکی است.درصد مولی (G+C) در این باکتری بین ٦۷/۵-٦۳/۵ درصد می‌باشد. در حال حاضر بر اساس طبقه بندی برگی[4] جنس ازتوباکتر جزء خانواده پسودوموناداسه می-باشد. این طبقه‌بندی در جدول (۱) ارائه شده است (گاریتی و همکاران، ۲۰۰۵).

ازتوباکتر هم‌اکنون دارای هفت گونه می‌باشد که به جزء گونه پاسپالی که با واریته تتراپلوئید گیاه پاسپالوم نوتانوم رابطه اختصاصی همیاری دارد، بقیه گونه‌ها به صورت آزادزی می‌باشند. اسامی گونه‌های مختلف ازتوباکتر در جدول (۲) نشان داده شده است.

خصوصیات مرفولوژیک ازتوباکتر

ازتوباکتر یک باکتری گرم منفی و دارای حالت چند شکلی (میله‌ای، بیضوی و کروی) با طول سه تا هفت

[1] -Taxoomy
[2] -Beijerinck
[3] -chroococcum
[4] - Bergys' Manual of Systematic Bacteriology

جدول ۱- طبقه بندی ازتوباکتر (گاریتی و همکاران، ۲۰۰۵)

طبقه بندی	
قلمرو(Domain)	باکتری‌ها (Bacteria)
سلسله(Kingdom)	باکتری‌ها (Bacteria)
شاخه(Phylum)	پروتئوباکتری‌ها (Proteobacteria)
رده(Class)	گاما-پروتئوباکتری‌ها (Gamma-proteobacteria)
راسته(Order)	سودودمونادال (Pseudomonadales)
خانواده(Family)	سودوموناداسه (Pseudomonadaceae)
جنس(Genus)	ازتوباکتر (Azotobacter)
گونه(Species)	۷ گونه (Spp)

جدول ۲- گونه‌های مختلف جنس ازتوباکتر (گاریتی و همکاران، ۲۰۰۵)

گونه	زیر گونه
A. chroococcum	
A.armeniacus.	
A. beijerinkii	
A. Nigricans	*nigricans*
	achromogenes
A. paspali	
A. salinestris	
A.vinelandii	

میکرون و با قطر متوسط ۱/۵ تا ۲ میکرون و یا بیشتر که به صورت منفرد، زوج با دسته‌های نامنظم، گاهی به صورت زنجیره‌هایی با طول‌های مختلف مشاهده می‌شود.گونه‌های ازتوباکتر فاقد توان اسپورزایی هستند ولی معمولاً تشکیل کیست یا سیست می‌دهند. به وسیله تاژک‌های پیرامونی متحرک بوده یا غیرمتحرک هستند.

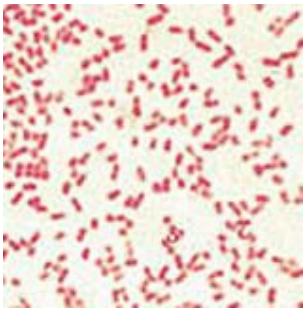
در کشت‌های کهنه، سلول ازتوباکتر متراکم و کروی شده و دیواره آن ضخیم‌تر می‌شود و در واقع تشکیل کیست می‌دهد. کیست‌ها در مقایسه با فرم رویشی در برابر شرایط نامساعد محیطی مانند گرما و خشکی مقاوم‌تر هستند.تشکیل کیست در ازتوباکتر با تولید پلی‌بتا هیدروکسی بوتیرات (PHB)[1] همراه است. در واقع قبل از تشکیل کیست، مقادیری پلی بتا هیدروکسی بوتیرات در باکتری تجمع می‌یابد که در زیر میکروسکوپ معمولی بصورت دانه‌های شفاف و بی‌رنگ دیده می‌شوند. کیست‌ها وقتی که به محیط کشت مناسب منتقل می‌شوند جوانه می‌زنند بطوریکه قسمت مرکزی آنها از نظر اندازه افزایش و شکاف‌هایی در پوشش کیست ظاهر شده و سلول آزاد می‌شود. کیست‌ها تحت شرایط خشکی ممکن است تا ده‌ها سال نیز بقاء عمر داشته‌باشند (مورنو و همکاران، ۱۹۸٦). در محیط کشت جامد فاقد نیتروژن، کلنی‌ها بعد از ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه ظاهر می‌شوند و با توجه به نوع قند در طی یک هفته قطری حدود دو تا شش میلی‌متر پیدا می‌کنند. کلنی‌ها معمولاً صاف، براق و مات با تحدب کم و چسبنده هستند. باتوجه به نوع گونه در کلنی‌ها رنگدانه‌های محلول یا نامحلول مختلف تولید می‌شود. سلول رویشی، کیست و کلنی *Azotobacter chroococcum* در شکل‌های یک، دو و سه نشان داده شده است (خسروی، ۱۳۷٦).

مهمترین گونه ازتوباکتر، گونه کروکوکوم است.این گونه از دو کلمه کروآ[2] به معنی رنگ و کوکوم[3] یعنی دانه منشاء گرفته‌است. از ویژگی‌های بارز این گونه تولید رنگدانه قهوه‌ای تا سیاه نامحلول در آب است (گاریتی و همکاران، ۲۰۰۵). کلنی *Azotobacter chroococcum* بر روی گل اشباع غنی شده با یک درصد پیروات سدیم در شکل (٤) نشان داده شده است. (خسروی، ۱۳۸۸).

[1]- Poly β-hydroxy butyrate

[2]- Chroa

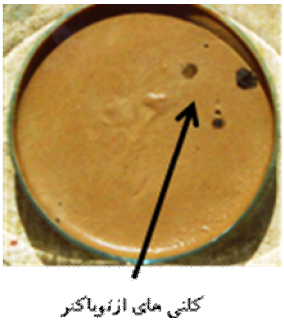
[3]- Coccum



شکل ۱- سلول رویشی ازتوباکتر

شکل۲- کلنی ازتوباکتر کروکوکوم (خسروی، ۱۳۷۶)

شکل ۳- کیست ازتوباکتر کروکوکوم (خسروی، ۱۳۷۶)



شکل ۴- کلنی ازتوباکتر کروکوکوم بر روی گل اشباع (خسروی، ۱۳۸۸)

ویژگی‌های فیزیولوژیک ازتوباکتر

ازتوباکتر یک باکتری هوازی بوده ولی می‌تواند در فشار کم اکسیژن نیز به رشد خود ادامه دهد.شیمیوارگانوتروف بوده و از قندها، الکل‌ها و نمک اسیدهای آلی برای رشد و تکثیر استفاده می‌نماید. قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی به صورت غیر همزیست بوده و می‌تواند حداقل ۱۰ میلی‌گرم نیتروژن مولکولی را به ازاء هر گرم از کربوهیدرات مصرفی (معمولاً گلوکز) تثبیت نماید. مولیبدن برای تثبیت نیتروژن ضروری است اما می‌تواند از وانادیم نیز به جای آن استفاده کند. اکثر گونه‌های ازتوباکتر قادر به استفاده از نمک آمونیوم و نیترات هستند، همچنین می‌توانند بعضی اسیدهای آمینه را به عنوان منبع نیتروژن مصرف کنند. ازتوباکتر دارای آنزیم کاتالاز و همین طور سوپراکسید دیسموتاز فعالی است که برای حفاظت آنزیم نیتروژناز در برابر اکسیژن ضروری است.

ازتوباکتر برای رشد بهینه[1] نیاز به آهن کافی دارد اما در محیط‌هایی با آهن کم نیز با تولید سیدروفورها قادر به رشد است. ترشح آمونیوم توسط ازتوباکتر کروکوکوم در خاک در حضور منگنز و کانی‌های رس گزارش شده است (نارولا و کوپتا، ۱۹۸٦).

تولید انواع هورمون‌ها مانند ایندول استیک اسید-(اکسین)، جیبرلین و سیتوکینین توسط سویه‌های مختلف ازتوباکتر محرز شده‌است. سنتز اسیدهای آمینه مانند آرجینین، لیزین، تریپتوفان، هیستیدین و بیوتین توسط گونزالز –لوپز و همکاران (۱۹۸۳) گزارش شده‌است.تولید انواع اگزوپلی ساکاریدها از جمله سنتز آلجینیک اسید توسط گونه‌های وینلاندی و کروکوکوم گزارش شده‌است (ارتسو و همکاران، ۱۹۹۸، سابرا، ۲۰۰۰).

[1] -Optimum

ویژگی‌های اکولوژیک ازتوباکتر

ازتوباکتر در خاک، محیط‌های آبی و سطح برگ گیاهان و در محدوده وسیع pH قادر به رشد و فعالیت بوده، با این وجود بهترین pH برای فعالیت این باکتری بین ۷/۵-۷ است و عمدتاً در خاک‌های خنثی یا قلیائی یافت می‌شود. ازتوباکترها معمولاً به حالت آزاد در سطح خاک و همچنین در قسمت ریزوسفر گیاهان مختلف یافت می‌شوند. با افزایش عمق خاک، جمعیت ازتوباکتر، کاهش می‌یابد. درجه حرارت مناسب برای فعالیت این ریزجاندار بین ۳۰-۲۰ درجه‌سانتیگراد می‌باشد. گونه غالب ازتوباکتر بستگی به پ‌هاش، دما و مقدار رطوبت خاک دارد. گونه غالب ازتوباکتر در مناطق معتدله همانند ایران گونه کروکوکوم[1] است. میزان کلسیم خاک از عناصر ضروری برای تشکیل کیست بوده و در توزیع ازتوباکتر مؤثر است.

ازتوباکتر به دلیل هوازی بودن نمی‌تواند شرایط بی‌هوازی را تحمل کند. بهترین رطوبت برای ازتوباکتر حد ظرفیت مزرعه بوده، به همین دلیل سلول‌های ازتوباکتر در سطح ریشه[2] حضور چندانی نداشته ولی در منطقه ریزوسفر به وفور یافت می‌شوند. کمبود مواد آلی از عوامل محدود کننده رشد ازتوباکتر محسوب می‌شود، لذا اضافه کردن موادآلی و هوموس به خاک بر رشد و جمعیت گونه‌های مختلف ازتوباکتر و تثبیت نیتروژن تأثیر بسزائی دارد و به همین دلیل ریزجانداران تجزیه‌کننده سلولز و بقایای گیاهی و حیوانی در خاک باعث افزایش رشد و جمعیت ازتوباکتر می‌شوند. میزان عناصر غذائی به خصوص نیتروژن و فسفر بر رشد ازتوباکتر موثر بوده بطوریکه افزودن کودهای فسفاتی رشد باکتری‌ها را افزایش می‌دهد، در حالی که افزودن بیش از حد کودهای نیتروژنی رشد ازتوباکتر را محدود می‌کند.

در خاک‌های تحت کشت که کود حیوانی به آنها داده‌شده جمعیت ازتوباکتر به طور قابل ملاحظه‌ای زیادتر است، معمولاً تعداد ازتوباکتر در هر گرم خاک کمتر از 10^4 است. بررسی‌ها بر روی خاک‌های کشاورزی و تحت کشت محصولات مختلف در استان‌های تهران، قزوین و البرز نشان داد که میانگین جمعیت *Azotobacter chroococcum* حدود $1/5\times10^3$ سلول در هر گرم خاک بود جدول (۳). در این گزارش آمده است که حداقل جمعیت ازتوباکتر در خاک هایی بوده است که چند سال متوالی به صورت آیش و نکاشت بوده‌اند و حداکثر جمعیت در خاک‌هایی بوده که در هنگام نمونه‌برداری محصول در مزرعه وجود داشته‌است (خسروی، ۱۳۷٦).برخی خصوصیات خاک‌های مورد بررسی در پژوهش مذکور در جدول (٤) ارائه شده است.

جدول ۳- جمعیت *Azotobacter chroococcum* در برخی مناطق ایران(خسروی،۱۳۷۶)

منطقه مورد مطالعه	جمعیت *Azotobacter chroococcum* (تعداد سلول در گرم خاک)		
	بیشینه	کمینه	میانگین منطقه
کرج	۷۵۳۳	۲۳۳	$1/9\times10^3$
شهریار و رباط کریم	۳۷۳۳	۲۳۳	$1/3\times10^3$
قزوین	۶۴۳۳	۲۰۰	$2/7\times10^3$
ورامین	۳۶۳۳	۳۳	$1/5\times10^3$
کل مناطق	۷۵۳۳	۳۳	$1/5\times10^3$

[1] -*chroococcum*
[2] -Rhizoplane

جدول ۴- برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی تعدادی از خاک‌های دارای ازتوباکتر (خسروی،۱۳۷۶)

بافت	شن	سیلت	رس	Total N	O.M	$CaCO_3$	ECe	pHe
				%			$ds.m^{-1}$	
لوم	۴۵/۲	۲۹	۲۵/۸	۰/۰۵	۰/۲۹	۷/۳	۴/۹۱	۸/۱
لوم رسی	۲۲/۸	۴۰/۸	۳۶/۴	۰/۱۱	۱/۷	۸/۵	۱/۲۶	۸/۳
لوم رسی	۲۸/۸	۳۹/۶	۳۱/۶	۰/۰۷	۱/۰۲	۹/۰	۲/۱۸	۸/۲
لوم	۳۷/۲	۴۱/۶	۲۱/۲	۰/۰۷	۰/۵	۲/۵	۰/۷۱	۸/۲
لوم	۳۱/۲	۴۴/۴	۲۴/۴	۰/۱	۱/۰۵۱	۱۳/۵	۱/۲۳	۸/۵
لوم رسی	۳۳/۶	۳۸/۰	۲۸/۴	۰/۰۹	۰/۸	۱۷/۵	۱/۰۰	۸/۴
لوم رسی	۳۶	۳۲/۲	۳۱/۸	۰/۰۹	۰/۷	۲۱/۵	۴/۴۵	۸/۴
لوم	۴۶/۲	۳۱	۲۲/۸	۰/۰۸	۰/۶	۱۷/۸	۱/۵	۸/۴
لوم رسی	۳۳/۲	۳۴/۴	۳۲/۶	۰/۰۹	۱/۲۳	۹/۰	۰/۵۹	۸/۳
لوم	۳۷/۲	۴۱/۶	۲۱/۲	۰/۰۸	۰/۵۳	۱۰/۵	۱/۹۴	۷/۷
لوم رسی	۲۹/۶	۳۵/۲	۳۵/۲	۰/۱	۱/۲۶	۱۰/۰	۱/۳۲	۸/۱
لوم رسی	۳۷/۲	۳۵/۴	۲۷/۴	۰/۱	۱/۲۶	۷/۵	۱/۸۶	۸/۲
لوم رسی شنی	۵۴/۸	۲۲/۴	۲۲/۸	۰/۰۶	۱/۰۲	۷/۸	۵/۴۳	۸/۰
لوم	۵۰/۸	۲۸	۲۱/۲	۰/۱	۱/۲۳	۹/۵	۲/۸۱	۸/۱
لوم رسی	۳۰/۴	۳۸/۴	۳۱/۲	۰/۱۳	۱/۶۳	۱۷/۸	۳/۵۴	۸/۳
رسی	۱۸/۴	۳۸/۴	۴۳/۲	۰/۰۸	۰/۷	۱۸/۰	۳/۸۱	۸/۱
لوم رسی	۲۸	۳۳/۲	۳۸/۸	۰/۰۶	۰/۹۷	۱۷/۵	۱/۶۷	۸/۲
رسی سیلتی	۱۸/۸	۴۰/۴	۱۸/۸	۰/۱۳	۱/۷۵	۱۵/۸	۱/۵۸	۸/۳
رسی	۲۱/۲	۳۴	۴۴/۸	/۱۰	۰/۹۴	۱۶/۸	۱/۹۱	۸/۲
لوم	۲۵/۲	۴۹	۲۵/۸	۰/۰۸	۰/۵۳	۱۶/۰	۳/۵۹	۷/۹
رسی	۱۵/۸	۳۵/۴	۴۸/۸	۰/۱	۱/۲۶	۱۷/۰	۱/۵۶	۸/۳
لوم رسی	۳۳/۸	۳۲	۳۴/۲	۰/۱	۰/۳۹	۲۱/۳	۱/۹۳	۸/۲
رسی	۱۸/۴	۳۵/۴	۴۶/۲	۰/۱	۱/۱۹	۲۰/۵	۷/۱۹	۸/۲

محیط کشت‌های مناسب برای رشد ازتوباکتر

محیط کشت‌های مختلفی برای ازتوباکتر ارائه شده‌است. سه نوع از معروف‌ترین این محیط کشت‌ها عبارتند از محیط کشت وینوگرادسکی، محیط کشت LG و محیط کشت بارک و رنی. این سه محیط کشت در پژوهشی برای جداسازی و شمارش باکتری‌های *Azotobacter chroococcum* بومی با استفاده از روش MPN مورد مقایسه قرارگرفتند. نتایج نشان داد محیط کشت وینوگرادسکی محیط بهتر و مناسب‌تری می‌باشد (خسروی، ۱۳۷٦). محیط کشت وینوگرادسکی شامل دو جزء به شرح زیر است. جزء اول (محلول وینوگراد) شامل: فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم، ۵، سولفات منیزیوم، ۲/۵، کلریدسدیم، ۲/۵، سولفات‌آهنIII ، ۰/۰۵ و سولفات‌منگنز، ۰/۰۵ گرم در یک لیتر آب مقطر حل و پ-هاش محیط در حدود ۷/۳ تنظیم و به عنوان محلول ذخیره در یخچال نگهداری می‌شود. جزء دوم (محلول عناصر کم مصرف): مقدار ۰/۰۵ گرم از هر یک از املاح مولیبدات‌پتاسیم، برات‌سدیم، نیترات‌کبالت، سولفات‌مس و سولفات‌روی در یک لیتر آب مقطر حل و به عنوان محلول ذخیره در یخچال نگهداری می‌شود. محیط کشت نهایی از ۵۰ میلی‌لیتر از محلول وینوگراد، ۱۰ گرم مانیتول ، یک میلی‌لیتر محلول عناصر کم مصرف ، ۰/۵ گرم کربنات سدیم و ۱۵ گرم آگار تهیه می‌شود (گاریتی و همکاران، ۲۰۰۵).

تثبیت نیتروژن در ازتوباکتر

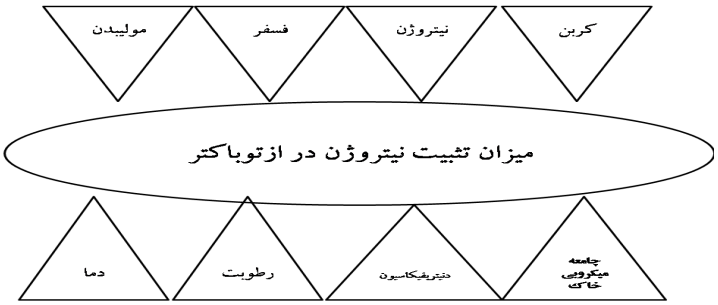
نیتروژن یکی از عناصر پرنیاز و مهم برای رشد گیاهان است. با وجود اینکه بیش از ۷۸ درصد ترکیب گازی جو زمین را نیتروژن مولکولی (N_2) تشکیل می‌دهد، اما این عنصر به شکل مولکولی برای گیاهان قابل جذب نبوده و این درحالی‌است که نیتروژن مهمترین عامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی در جهان است (دیکسون و ویلر، ۱۹۸٦). مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی یکی از راه‌های معمول برطرف کننده این محدودیت می‌باشد که از یک سو مهمترین نهاده کشاورزی مؤثر در افزایش تولید بوده و از سویی دیگر از پتانسیل آلوده‌سازی بالایی برخوردار است. مصرف بی‌رویه و غیراصولی کودهای شیمیایی نیتروژنی باعث آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی و در نهایت موجب مسمومیت انسان، دام و آبزیان می‌شوند. همچنین مشکل افزایش نیترات زدایی (دی‌نیتریفیکاسیون) و در نتیجه تولید بیشتر گازهای اکسید نیتروژنی و تخریب لایه حیاتی ازن را نیز به همراه دارند.

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 تبدیل و یا در مورد دی-ازوتروف‌های (تغذیه کنندگان از نیتروژن) همزیست، در اختیار گیاه میزبان قرارمی‌گیرد. به این ترتیب به یاری دی-ازوتروف‌ها این عنصر حیات بخش بطور مداوم به درون سیستم خاک تزریق می‌شود و ادامه زندگی را برای سایر موجودات امکان‌پذیر می‌سازد (دیکسون و ویلر، ۱۹۸٦، استون- سن،۱۹۸۲، اسپرنت و اسپرنت، ۱۹۹۰).

کل نیتروژن تثبیت شده روی زمین در حدود ۲۵۰ میلیون تن در سال برآورد شده که در حدود ۱۹۵ میلیون تن آن مربوط به تثبیت زیستی نیتروژن است. ۷۰ درصد این مقدار مربوط به سهم تثبیت همزیستی است.باکتری‌های همانند ازتوباکتر که در بیشتر اکوسیستم-ها که سیستم همزیستی وجود ندارد دارای اهمیت قابل توجه هستند. در اکوسیستم‌های جنگلی نقش ازتوباکتر در تثبیت نیتروژن بیشتر از انواع همزیستی است و برآورد شده است که مقدار تثبیت بیشتر از ۱۰ کیلوگرم N در هکتار در سال باشد (راید و همکاران، ۲۰۱۱).

اندازه‌گیری مقدار تثبیت نیتروژن در نمونه‌های کوچک خاک آسان است اما در مقیاس اکوسیستمی که تنوع و فراوانی از نظر زمانی و مکانی زیاد است، برآورد نیتروژن تثبیت شده توسط سیستم‌های آزادزی از جمله ازتوباکتر را مشکل می‌سازد. کیزیلکایا (۲۰۰۹) با بررسی ظرفیت تثبیت نیتروژن ازتوباکتر در محیط کشت و خاک-های شمال آناتولی ترکیه گزارش داد مقدار تثبیت نیتروژن بین ۳/۵ تا ۲۹/٤۵ و میانگین ۱۰/۲٤ میلی گرم در لیتر در محیط کشت بوده است همچنین در خاک‌های لوم رسی شنی فعالیت تثبیت زیستی نیتروژن بیشتر از خاک‌های لوم و لوم رسی بوده است.

شواهد آزمایشگاهی و مزرعه‌ای نشان داده است عوامل زنده و غیرزنده زیادی بر فعالیت تثبیت نیتروژن در ازتوباکتر می‌تواند مؤثر باشد، در واقع می‌توان گفت عوامل و شرایطی که بر فرآیند تثبیت نیتروژن مؤثر است بر فعالیت ازتوباکتر به عنوان یک تثبیت کننده نیتروژن می-تواند مؤثر باشد. مشخص شده است که اگر نیتروژن قابل دسترس در محیط وجود داشته باشد ازتوباکتر از آن استفاده نموده و دیگر تثبیت نیتروژن انجام نمی‌دهد، اما این موضوع در محیط های طبیعی صحت نداشته و تثبیت N_2 همچنان توسط ازتوباکتر ادامه دارد. عوامل مؤثر در تثبیت نیتروژن در ازتوباکتر در شکل پنج به صورت شماتیک خلاصه شده‌است.



شکل ۵- عوامل زنده و غیر زنده مؤثر در تثبیت نیتروژن در ازتوباکتر

نقش ازتوباکتر در کشاورزی

همانطوریکه اشاره‌شد تبخیر، تصعید و دنیتریفیکاسیون اوره از طریق تولید گازهای گلخانه‌ای N_2O، NO و NH_3 موجب مشکلات زیست محیطی می-شوند، همچنین از دست رفتن نیتروژن توسط آبشویی موجب آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شود. این مسائل دانشمندان را بر آن داشته‌است تا به فکر جایگزین‌های مناسب برای تامین نیتروژن مورد نیاز محصولات کشاورزی باشند. در این میان استفاده از پدیده تثبیت زیستی نیتروژن بیش از همه مورد توجه قرارگرفته است.

تحقیقات مختلف نشان داده است که نقش ازتوباکتر در رشد گیاه عمدتا به واسطه تولید هورمون‌های محرک رشد همانند اکسین‌ها، جیبرلین‌ها، سیتوکینین‌ها و اتیلن، توان حل‌کنندگی فسفات‌ها، افزایش جذب عناصر، افزایش مقاومت به تنش‌ها، تولید ویتامین‌ها و بیوکنترل عوامل بیماریزای گیاهی می‌باشد (کندی و همکاران، ۲۰۰٤).پژوهش‌ها در رابطه با مایه تلقیح‌های حاوی باکتری‌های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن برای غیر لگوم‌ها و از جمله غلات تاکنون نتوانسته است همانند ریزوبیوم‌ها در لگوم‌ها به عنوان جایگزین مطمئنی برای کود شیمیایی نیتروژنی باشد. بیشتر آزمایشات اولیه در روسیه، اروپای شرقی و هندوستان انجام شده‌است که در مجموع فقط یک سوم از آزمایشات منجر به افزایش محصول شد.آزمایش‌هایی که در سال‌های ٦۰-۱۹۵۸ برای تعیین و ارزیابی چگونگی واکنش گیاهان به مواد تلقیحی ازتوباکتر در شرایط مزرعه در اتحاد جماهیر شوروی سابق انجام شد نشان داد در هشت آزمایش از کل ۲۳ آزمایش مزرعه-ای، عملکرد گیاه به‌طور محسوسی افزایش نشان‌داد که خود حاکی از تاثیر مثبت و مطلوب تلقیح بود. 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 آب‌وهوایی انجام و نتیجه نشان داد بین ۱۲-۷ درصد افزایش عملکرد حاصل شده‌است. این افزایش عملکرد به دلیل تثبیت نیتروژن مولکولی بود اما تولید اکسین، ویتامین‌ها و هورمون‌های محرک رشد و مواد ضد قارچی نیز اثرات مفیدی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهان داشته‌است (سوباراو,۱۹۸۸).

عملکرد و جذب نیتروژن گندم پاییزه در اثر تلقیح با باکتری‌های ریزوسفری از جمله ازتوباکتر کروکوکوم قابل توجه ذکر شده‌است (رناتودفریتاس، ۲۰۰۰). رای و گاور (۱۹۸۸) اثر ازتوباکتر و آزوسپیریلوم را بر رشد و عملکرد گندم بررسی و گزارش دادند که 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 کرده‌اند. اثرات مثبت تلقیح توام ازتوباکتر و ریزوبیوم بر گره‌بندی سویا، ماش و شبدر معنی‌دار گزارش شده‌است (بورنز و همکاران، ۱۹۸۱).

اثر تلقیح توام ازتوباکتر و ریزوبیوم بر موفقیت تلقیح و عملکرد باقلا و جذب عناصر معدنی مثبت گزارش شده‌است (رودلاس، ۱۹۹۹). اثر ازتوباکتر کروکوکوم در حل کردن فسفات‌های غیرآلی و افزایش رشد گندم بدین واسطه مثبت گزارش شده‌است (کومار و نارولا، ۱۹۹۹). جرک و همکاران (۲۰۰۶) گزارش‌دادند که در اثر تلقیح گندم بوسیله ازتوباکتر ۱۱-۸ درصد عملکرد آن افزایش یافت.

در آزمایشی تاثیر تلقیح با ازتوباکتر و میکوریز درونی (*Glomus fasciculatum*) بر فاکتورهای مختلف رشد در گیاه گوجه‌فرنگی بررسی شد. نتایج نشان داد که شاخص سطح برگ، وزن خشک اندام‌هوایی، میزان فسفر و نیتروژن برگ‌ها و در نتیجه میزان محصول نسبت به تیمار شاهد که هیچ تلقیحی روی آن انجام نگرفته بود را افزایش داد (مهنداس، ۱۹۸۷).مانسک و همکاران (۱۹۹۵) بذرهای مختلف گندم را با سویه‌های مختلف ازتوباکترکروکوکوم تلقیح نمودند نتایج نشان‌داد که ازتوباکتر با تولید انواع هورمون‌های 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 عملکرد دانه افزایش یابد.

همچنین تاثیر سویه‌های مختلف ازتوباکتر و میکوریز درونی بر 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 جوانه‌زنی بالاتری برخوردار بودند دارای میزان کلروفیل بالاتر و شاخص سطح برگ بیشتری بودند (شارما و بوتانی، ۱۹۹۸). اثر تلقیح ازتوباکتر به عنوان باکتری محرک رشد به همراه مواد آلی برروی گیاه ذرت بررسی و نتایج نشان داد که قابلیت جذب نیتروژن و فسفر و میزان محصول ذرت به طور قابل توجهی افزایش یافت (هنساودین ،۲۰۰۳). بارال و ادهیکاری (۲۰۱۳) در آزمایشات مزرعه‌ای دو ساله در کشور نپال گزارش دادند در اثر تلقیح ذرت با ازتوباکتر بین ۱۵ تا ۳۵ درصد عملکرد دانه افزایش یافت.

خسروی (۱۳۷۶) اثر تلقیح باکتری‌های بومی *Azotobacter chroococcum* را بر رشد گندم و افزایش سیستم ریشه‌ای آن در یک آزمون گلخانه‌ای مثبت گزارش نمود. خسروی و محمودی (۱۳۹۲) اثر تلقیح ازتوباکتر در ترکیب با کود دامی را بر رشد گندم دیم معنی‌دار گزارش نمودند. خسروی (۱۳۸۸) تعداد ۲۱۷ جدایه *Azotobacter chroococcum* از ۳۶۲ نمونه خاک از مزارع زیر کشت گندم در ایران را جداسازی و شناسایی نمود جدول (۵).

جدول ۵- تعداد نمونه خاک، جدایه خالص شده و انتخاب شده برای کشت گلخانه‌ای

استان مورد نمونه‌برداری	تعداد نمونه	تعداد ایزوله جداسازی شده	تعداد مورد تأیید	تعداد انتخاب شده برای مرحله گلخانه‌ای
آذربایجانشرقی	۵۵	۳۰	۱۵	۳
آذربایجانغربی	۵۹	۲۲	۱۳	۱۱
گلستان	۲۰	۱۸	۱۲	۷
کردستان	۲۹	۲۰	۹	۲
فارس	۵۸	۳۵	۱۸	۷
خراسان	۱۴۱	۹۲	۳۵	۷
جمع	۳۶۲	۲۱۷	۱۰۲	۳۷

اثر تلقیح سویه‌های برتر حاصل از پژوهش فوق بر رشد گندم در مناطق مختلف بررسی و نتایج متفاوتی بدست آمد. در این پژوهش عملکرد دانه گندم نسبت به شاهد بدون تلقیح حداکثر تا ۲۰ درصد افزایش نشان داد.روش‌ها و مقادیر کاربرد مایه تلقیح ازتوباکتر برای محصولات مختلف متفاوت است. جمعیت باکتری معمولا به صورت تعداد باکتری در میلی‌لیتر یا گرم مایه تلقیح به ازای هر بذر یا نهال یا نشاء و یا بر حسب کیلوگرم یا گرم برای انواع مایه تلقیح جامد و میلی‌لیتر یا لیتر برای انواع مایه‌تلقیح مایع توصیه می‌شود. در جدول شش، مقدار و طریقه مصرف مایه تلقیح ازتوباکتر در منابع مختلف ارائه شده است.

جدول ۶- مقدار مایه تلقیح ازتوباکتر توصیه شده برای محصولات مختلف

گیاه هدف	جمعیت در مایه تلقیح	نحوه مصرف	مقدار مصرف	منبع
گندم دیم	10^8 سلول در گرم	تلقیح بذری	۳۰ گرم در ۵۰ متر مربع	خسروی و محمودی،۱۳۹۲
گندم آبی	10^8 سلول در میلی لیتر	تلقیح بذری	۳۰ گرم در ۶۰ متر مربع	خسروی، ۱۳۸۸
نهال سیب	10^7 سلول در میلی لیتر	خاک و نهال	۵۰ میلی‌لیتر به ازاء هر نهال	خسروی و همکاران،۲۰۰۹
گندم (گلخانه)	10^8 سلول در میلی لیتر	تلقیح بذری	یک میلی لیتر به ازاء هر بذر	خسروی، ۱۳۷۶
گندم	10^6 سلول در میلی لیتر	خاک و بذر	۲۵ میلی‌لیتر در ۵ متر مربع	جرک و همکاران،۲۰۰۶
گندم	10^8 سلول در میلی لیتر	بذری	۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری	میلوشویچ ،۲۰۱۲

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 بر رشد گندم در هشت نقطه ایران گزارش داد که تلقیح هیچ اثر مثبتی بر رشد گندم نداشته‌است. خسروی (۱۳۹۱) با بررسی اثر یک نوع مایه تلقیح ازتوباکتر تجاری تولید داخل بر رشد ذرت در ۱۰ نقطه ایران گزارش نمود که تلقیح هیچ اثر مثبتی بر رشد این محصول نداشته است. از دلایل عدم قطعیت در تاثیر تلقیح ازتوباکتر بر رشد محصولات کشاورزی می‌توان موارد زیر را ذکر نمود.

ازتوباکتر یک باکتری هتروتروف است و برای رشد و فعالیت خود نیاز به منابع کربنی ساده دارد. اکثر خاک‌های کشاورزی از جمله خاک‌های ایران دارای مقدار مواد آلی کم هستند. البته در شرایطی که ریزوسفر گیاه بتواند منابع کربنی باکتری را فراهم نماید احتمال موفقیت تلقیح افزایش می‌یابد. بین نتایج آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای همیشه و در همه نقاط رابطه مثبت و معنی‌داری وجود ندارد. یکی از دلایل این مسئله می‌تواند شرایط متفاوت آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه از جنبه‌های مختلف از جمله شرایط دما، رطوبت، نوع خاک و نوع واریته گیاهی باشد. یکی دیگر از دلایل این مسائل می‌تواند تفاوت در نوع و سویه باکتری باشد زیرا در پژوهش‌های مختلف از سویه‌های مختلف با خصوصیات محرک رشدی مختلفی استفاده می‌شود.

مایه تلقیح مختلف به معنی سویه‌های مختلف است که ممکن است تشابه زیادی از نظر تاثیر بر رشد گیاه نداشته باشند، لذا قیاس نتایج حاصل از استفاده از مایه تلقیح‌ها ممکن است دارای خطای آزمایشی فراوانی باشد. مسئله دیگر تفاوت زیاد موجود بین محیط ساده و تحت کنترل آزمایشگاهی با فضای پیچیده خاک است، به طوریکه یک سویه معین ازتوباکتر ممکن است در شرایط آزمایشگاهی دارای خصوصیات محرک رشدی قابل توجهی باشد در صورتیکه در محیط خاک ممکن است این خصوصیات مجال بروز و ظهور نداشته باشند.

دلایل مختلفی می‌تواند برای این مسئله عنوان شود که از مهمترین آنها می‌توان به عدم توان رقابت سویه تلقیح شده با سایر موجودات ریزوسفری، جذب سطحی مواد و هورمون‌های تولید شده توسط باکتری بوسیله ذرات آلی و معدنی خاک، غیر فعال‌شدن آنزیم‌ها و هورمون‌های تولیدی به علت پ‌هاش، زیادی املاح،

شرایط رطوبتی ، از بین رفتن باکتری توسط فاژها (ویروس‌های حمله کننده به باکتری‌ها)، وجود آنتی بیوتیک‌ها و مواد بازدارنده رشد باکتری‌ها در ریزوسفر اشاره نمود.

نقش ازتوباکتر در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی

برخی سویه‌های ازتوباکتر توانائی تولید آنتی بیوتیک‌ها و دیگر مواد باز دارنده رشد عوامل بیماری‌زای گیاهی را دارند. این آنتی‌بیوتیک‌ها جزء متابولیت‌های ثانویه بوده که در شرایط خاصی تولید و انباشته شده و به حفظ تعادل گروه‌های میکروبی موجود در خاک کمک کرده و از طرف دیگر روی عوامل بیماریزای گیاهی اثر منفی گذاشته و به حفظ سلامت گیاه کمک می‌کنند. استفاده از باکتری‌های ریزوسفری همانند ازتوباکتر برای از بین بردن عوامل بیماریزای گیاهی اعم از قارچ یا باکتری که به عنوان کنترل بیولوژیک از آن یاد شده و با استفاده از همین مکانیسم بیماری‌های زیادی مانند پاخوره گندم، پوسیدگی سیاه در تنباکو، پژمردگی فوزایوزمی در گوجه فرنگی و لوبیا و پوسیدگی ریشه در نیشکر کنترل شده‌اند (ویسوانتان و سامیاپان، ۲۰۰۲ و ولر،۱۹۸۳).

در این نوع مبارزه آفات و بیماری‌ها قادر نبوده یا به کندی قادر هستند در برابر این مبارزه مقاومت پیدا کنند. یکی از دلایل ضعف مبارزه شیمیایی مقاومت پیدا کردن آفات و عوامل بیماریزای گیاهی در طی زمان می‌باشد و از طرف دیگر کنترل زیستی بیماریها از به وجود آمدن مشکلات زیست محیطی ناشی از به کاربردن آفت کش‌ها و سموم جلوگیری به عمل می‌آورد. واکنش-های آنتاگونیستی در منطقه ریزوسفر نسبت به خاک اطراف شدیدتر می‌باشد زیرا عوامل بیماریزای خاکزی برای جوانه زدن، رشد و فعالیت و نفوذ در سلول‌های میزبان به عناصر غذائی از جمله کربن، نیتروژن و آهن نیاز دارند. از طرفی ریزجانداران موجود در خاک نیز از جمله ازتوباکتر برای بدست آوردن عناصر غذایی با عوامل بیماریزای گیاهی رقابت کرده و موجب کنترل بیولوژیکی بیماری می‌گردند.

در مبارزه بیولوژیک از طریق مکانیسم‌های رقابتی مثل روابط انگلی، شکار و اشغال جایگاه‌های مناسب بر ریشه یا از طریق تولید مواد بازدارنده رشد مثل باکترئوسین‌ها[1] یا تولید آنزیم‌های کیتیناز و حل نمودن دیواره سلولی قارچ‌ها و عوامل بیماریزا می‌توان میزان خسارت وارد شده به گیاه میزبان را کاهش داد (ویسوانتان و سامیاپان، ۲۰۰۲ و گزو و همکاران، ۲۰۰۲). از طرف دیگر باکتری‌های مفید از جمله ازتوباکتر با تولید انواع هورمون‌های محرک رشد، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و یونوسفرها از جمله سیدروفورها و افزایش حلالیت و جذب عناصر غذائی مانند آهن، فسفر و روی سبب تقویت گیاه شده و از به وجود آمدن بیماری به عنوان یک عارضه ثانویه جلوگیری به عمل می‌آورند.

خسروی (۱۳۷٦) گزارش داد یک سویه بومی *Azotobacter chroococcum* در شرایط درون شیشه-ای[2] رشد میسلیوم‌های قارچ فوزاریوم گندم را کنترل نمود شکل (٦).

شکل ۶- کنترل رشد قارچ فوزاریوم گندم توسط ازتوباکتر (الف) و (ب) فاقد توان کنترل قارچ (خسروی، ۱۳۷۶)

ازتوباکتر در محیط آزمایشگاه، وزن خشک میسلیوم قارچ‌های بیماریزا مانند فوزاریوم[3]، ریزوکتونیا[4]، ریزوکتونیا[4]، فیتیوم[5] و اسکلروتینیا را به میزان قابل توجهی کاهش داد (هاسوانا و همکاران، ۱۹۹۸). در یک آزمایش گلدانی تلقیح بذر خردل با ازتوباکتر کروکوکرم یا

[3]-Bacterocin
[2]- In Vitro
[1]-Fusarium
[2]-Rhizoctonia
[3]-Pythium

تلقیح به خاک میزان پوسیدگی ناشی از قارچ اسکلروتینا را کاهش داد. این کاهش بیماری به دلیل بهبود رشد گیاه ناشی از تولید سیدروفور و محروم شدن عامل بیماریزا از آهن توسط این باکتری بود (سونجا و همکاران، ۱۹۹٤).

موتوسلوان و بالاگروناتان (۲۰۱۳) گزارش دادند ازتوباکتر به واسطه تولید سیدروفور توان کنترل رشد قارچ های فوزاریوم، آلترناریا، اسکلـروتینیـا و فیتوفترا را داشته-است.با این وجود اطلاعاتی در رابطه با تولید و مصرف مایه تلقیح ازتوباکتر برای صرفا این منظور خاص مشاهده نشده‌است. مایه تلقیح های تولید شده در برخی کشورها همانند هندوستان بیشتر از نظر کود زیستی محرک رشد گیاه معرفی شده اند تا به عنوان کنترل کننده عوامل بیمازای گیاهی.

نقش ازتوباکتر در زیست‌پالایی عناصر سنگین

زیتوده و پلی‌مرهای میکروبی ازتوباکتر می‌توانند نقش مؤثری در خارج کردن عناصر سنگین از فاضلاب-های کشاورزی و صنعتی داشته باشند. هنگامی که ازتوباکتر به فاضلاب‌ها اضافه می‌گردد این باکتری با تولید انواع پلی‌ساکاریدهای کپسول مانند و اگزوپلی‌ساکاریدها سبب خارج شدن میزان قابل توجهی از عناصر سنگین و مضر همانند سرب، نیکل، کادمیوم و ... می‌گردد. در تحقیقی در ایتالیا شش لیتر از فاضلاب رقیق شده حاوی پنج درصد موادآلی با ازتوباکتر وینلندی تلقیح و پس از دو هفته بیوماس میکروبی به وسیله دستگاه سانتریوفوژ جداسازی و پلی ساکاریدهای تولید شده توسط ازتوباکتر نیز عصاره‌گیری و ارزیابی شدند. نتایج نشان داد عناصر کادمیوم و سرب از محلول فاضلاب خارج شده‌اند (پاستی و همکاران، ۱۹۹٦).

جیوه یکی از عناصر مضر جهت سلامت انسان و حیوانات می‌باشد که از طریق احتراق ناقص سوخت‌ها یا دود بعضی از کارخانجات به محیط زیست وارد می‌شود.برخی گونه‌های ازتوباکتر توانایی سنتز دو آنزیم مرکوریک‌ردوکتاز و ارگانومرکوریال‌لیاز را دارند و قادرند ترکیبات آلی و معدنی جیوه را تجزیه نمایند. آنزیم مرکوریک‌ردوکتاز، Hg^{+2} موجود در ترکیبات معدنی جیوه را به $Hg_{(0)}$ تبدیل و به علت فشار بخار زیاد به خارج از سیستم متصاعد می‌گردد. برای تجزیه ترکیبات آلی جیوه آنزیم ارگانو مرکوریال لیاز وارد عمل شده ابتدا پیوندهای کربن–جیوه را به Hg^{+2} تبدیل و سپس آنزیم مرکوریک ردوکتاز وارد عمل شده و Hg^{+2} را به $Hg_{(0)}$ تبدیل می‌نماید (گوش و همکاران، ۱۹۹٦).

ازتوباکتر در خاک‌های غیر کشاورزی و اکوسیستم‌های طبیعی

ازتوباکتر همانند سایر باکتری‌های آزادزی که وابستگی به گیاه ندارند در اکوسیستم‌های اولیه کره زمین که هنوز گیاهان به وجود نیامده بودند نقش مهمی را ایفاء نموده‌اند. امروزه نیز ازتوباکتر در بسیاری از اکوسیستم‌های کره زمین و عرصه‌های منابع طبیعی حضور داشته و نقش مهمی را ایفا می‌کند. گونه‌های مختلف ازتوباکتر در شرایط مختلف آب و هوائی از مناطق بسیار گرم و حاره تا مناطق قطبی و در محدود pH سه تا نه یافت می‌شوند.

میزان تثبیت نیتروژن در باکتری‌های هوازی غیر فتوسنتزی آزادزی همانند ازتوباکتر به شرایط رطوبتی، غلظت اکسیژن و تأمین سوبسترای کربن بستگی دارد همچنین مقادیر مولیبدن و فسفر نیز از عوامل تعیین کننده مقدار و فعالیت تثبیت آزادزی ذکر شده است (راید و همکاران، ۲۰۱۱). با افزایش ارتفاع منطقه ظرفیت تثبیت نیتروژن افزایش می‌یابد و این مسئله را می‌توان به کاهش فشار اکسیژن در ارتفاعات نسبت داد که کار تثبیت نیتروژن را در دی ازوتروف‌های آزادزی از جمله ازتوباکتر را تسهیل می‌کند. لذا در مناطقی همانند مراتع مرتفع تر شاید بتوان گفت که میزان تثبیت نیتروژن بیشتر از اراضی پست باشد.

در اکوسیستم‌های جنگلی نقش ازتوباکتر در تثبیت نیتروژن بیشتر از انواع همزیستی (بیش از ۱۰ کیلوگرم N در هکتار در سال) برآورد شده است با اینحال

همانطوریکه قبلا اشاره شد اندازه‌گیری تثبیت نیتروژن در مقیاس اکوسیستمی توسط سیستم‌های آزادزی از جمله ازتوباکتر مشکل است. راید و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی منابع علمی مختلف مقدار تخمینی تثبیت نیتروژن در سیستم همزیستی و آزادزی در زیست بوم‌های مختلف را به صورت جدول (۷) ارائه دادند.

جدول ۷ – تخمین تثبیت نیتروژن در سیستم همزیستی و آزادزی در زیست‌بوم‌های مختلف

نوع زیست بوم	میزان تثبیت نیتروژن ($kg\ N.ha^{-1}.year^{-1}$)	
	آزادزی	همزیستی
توندرا	۰/۴-۳	۱-۴/۹
جنگل‌های چوبی نواحی شمالی	۰/۳-۳/۸	۰/۳-۶/۶
جنگل‌های نواحی معتدل	۰/۰۱-۱۲	۱-۱۶۰
مراتع نواحی معتدل	۰/۱-۲۱	۰/۱-۱۰
دشت‌های هموار گرمسیری	۳-۳۰	۳-۹۰
نواحی جنگلی همیشه سبز	۰/۱-۶۰	۵/۵-۱۶
دشت‌های سیلابی گرمسیری	۴/۱-۱۲	۱۴-۲۸/۵
جنگل‌های خزان‌کننده گرمسیری	۳/۳	۷/۵-۳۰
بوته‌زارهای مدیترانه‌ای	۱	۰۱/۱-۱۰
نواحی بیابانی	۰/۰۱-۱۳	۰/۷-۲۹/۵

مشکلات و محدودیت های کاربرد مایه‌تلقیح‌های ازتوباکتر

توان تثبیت نیتروژن ازتوباکتر به اندازه ریزوبیوم-های همزیست با گیاهان لگوم نیست. بنابراین تلقیح با ازتوباکتر در بیشتر موارد قادر به تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاه نمی‌باشد. به دلیل زندگی مستقل از گیاه (آزادزی بودن) و نیاز به منابع کربنی ساده، از طرف دیگر به علت پایین بودن میزان مواد آلی در اکثر خاک‌ها بویژه خاک‌های کشاورزی رشد و فعالیت ازتوباکتر محدود می‌شود.

به علت وجود سیستم پیچیده بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی خاک‌های مختلف سرنوشت سویه‌های ازتوباکتر تلقیح شده به خاک نامشخص و اثر بخشی آنها در همه مکان‌ها و زمان‌های مختلف خیلی قابل تضمین نیست. دستیابی به سویه معینی از ازتوباکتر که قادر باشد تمام خصوصیات منسوب به PGPR را یکجا داشته باشد به طور طبیعی بسیار مشکل است.

مزیت های نسبی ازتوباکتر به عنوان مایه تلقیح

ازتوباکتر به علت توان تشکیل سیست، دارای مقاومت زیاد در برابر خشکی و کمبودهای تغذیه‌ای است به همین دلیل ماندگاری طولانی مدتی هم در بسته‌های مایه تلقیح و هم در شرایط خاکی و اقلیمی مختلف را دارد. به علت خصوصیات تیپیک سلول‌ها و کلنی‌های درشت و مشخص ازتوباکتر، تولید صنعتی و کنترل کیفی محصول برای تولید کننده از مشکلات نسبی کمتری برخوردار است. با توجه به سیستم آزادزی تثبیت نیتروژن در ازتوباکتر، کاربرد مایه تلقیح آن از نظر نوع محصول هدف با محدودیت‌های نسبی کمتری مواجه است.

راهکارهای پیشنهادی برای کاربرد ازتوباکتر در کشاورزی و عرصه‌های منابع طبیعی

غربالگری ازتوباکتر بر روی محصولات مختلف اعم از زراعی، باغی و مراتع و جنگل‌ها.

تجمیع و تکمیل بانک باکتری‌های ازتوباکتر و بررسی خصوصیات مختلف منسوب به محرک رشد گیاه.

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. توسعه پژوهش‌های مبتنی بر بیوتکنولوژی و تجمیع صفات محرک رشدی مختلف در یک سویه معین.

رهیافت ترویجی

ازتوباکتر دارای پتانسیل‌های مفید فراوانی است که با شناخت سویه‌های برتر دارای مزیت‌های مختلف می‌توان از این پتانسیل در جهت مدیریت بهتر حاصخیزی خاک‌های کشاورزی و اراضی مرتعی و جنگلی بهره جست. در این راستا بهره‌گیری از سویه‌های بومی این

باکتری این قابلیت را دارد که بخشی از نیاز گیاه به عناصر غذایی در شرایط عادی و یا شرایط سخت همانند خشکی و شوری حاکم بر خاک‌های ایران را فراهم نماید. بنابراین بکارگیری و عملیاتی نمودن راهکارهای ارائه شده در این مقاله به عنوان رهیافتی مهم در این زمینه می باشد.

فهرست منابع

۱. خسروی، ه. ۱۳۸۸. دستیابی به دانش فنی تولید کود بیولوژیک ازتوباکتر برای مزارع گندم. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، نشریه شماره ۱٤٥۰. ۲٤ صفحه.

۲. 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.

۳. خسروی، ه. و. محمدی، ح. ۱۳۹۲. بررسی اثرات مایه تلقیح ازتوباکتر به همراه کود دامی بر رشد گندم دیم. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، جلد سه شماره دو صفحات ۲۱۹-۲۰۵.

٤. 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.

۵. خسروی، ه. ۱۳۷٦. بررسی فراوانی و انتشار ازتوباکتر کروکوکوم در خاکهای زراعی استان تهران و مطالعه برخی از خصوصیات فیزیولوژیک آن. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران. تهران: ۱۱۱ صفحه.

6. Baral, B.R. and P. Adhikari 2013. Effect of Azotobacter on growth and yield of maize. SAARC Journal of Agriculture, 11(2): 141-147.
7. Beijerinck, M.W, 1901, Uber oligonitrophile mikroben, centralblatt fur bakteriologie, parasitenkunde, Infektions krankheiten und Hygiene, Abteilung II, 7: pp. 561–582
8. 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.
9. Dixon, R. O. D., and C. T. Wheeler, 1986. Nitrogen Fixation in Plants. Chapman and Hall, NewYork.
10. Ertesvag, H., F. Erlien, G. Skjak-Braek, B.H. Rehm, S. Valla. 1998. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. Journal of Bacteriology, 180: 3779-3784.
11. Garrity, G.M., J.A. Bell and T. Lilburn. 2005. Class III.*Gammaproteobacteria* class. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (*The Proteobacteria*), part B (*The Gammaproteobacteria*), p. 1. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
12. Ghosh, S., P.C. Sadhukhan, and D.K. Ghosh. 1996. Studies on the effect of mercury and organomercurial on the growth and nitrogen fixation by mercury-resistant Azotobcter strains. Journal of Applied Bacteriology, 80:319-326.
13. Gonzalez-lopez, J., V. Salmeron, J.Moreno, and R.A. Cormenzana.1983. Amino acids and vitamins produced by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically defined media and dialyzed soil media. Soil Biology and Biochemistry, 15: 711-713.

14. 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.
15. Hassouna, M.G., M.A.M. El-Saedy- and H.M.A. Saleh. 1998. Biocontrol of soil-borne plant pathogens attacking cucumber (*Cucumis sativus*) by rhizobacteria in a semiarid environment. Arid-Soil-Research and Rehabilitation. 12: 345-357.
16. Jarak, M., R. Protic, J. Snezana, and J. Colo. 2006. Response of wheat to Azotobacter –Actionmycetes inoculationand nitrogen fertilizers. Romanian Agricultural Research, 23: 37-42.
17. Kennedy I.R., A.T.M.A. Choudhury, M.L. Kecskes.2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biology and Biochemistry, 36:1229–1244.
18. Khosravi. H., S.M. Samar, E. Fallahi, H. Davoodi, and 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.
19. Kizilkaya, R. 2009. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter spp.* strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. Journal of Environmental Biology, 31(1): 73-82.
20. Kumar, V. and N. Narula. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biology and Fertility of Soils, 28: 201-305.
21. 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. Journal of Applied Botany, 69: 108-110.
22. Milosevic N., B. Tintor, R. Protic, G. Cvijanovi, T.Dimitrijevi. 2012 . Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on wheat yield and seed quality. Romanian Biotechnological Letters, 17 (3): 7352-7357.
23. 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.
24. Moreno, J., J. Gonzalez-Lopez, and G.R. Velta. 1986. Survival of *Azotobacter* spp. in dry soils. Applied and Environmental Microbiology, 51: 123-125.
25. Muthuselvan I. and, R. Balagurunathan. 2013. Sidrophore production from *Azotobacter sp.* and its application as biocontrol agent. International journal of Current Research and Review, 5(11): 23-35.
26. Narula, N., and K.G. Kupta.1986. Ammonium excretion by *Azotobacter chroococcum* in liquid culture and soil in the presence of manganese and clay minerals. Plant and Soil, 93: 205-209.
27. Pasetti L, F. Fiorelli, U. Tomati. 1996. Azotobacter biomass production from olive mill wastewater for heavy metal recovery. International Biodeterioration and Biodegradation, 38(3-4):163-4.
28. 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.
29. Reed, C.S., C.C. Cleaveland and A.R. Towsend. 2011. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective. Annual Review of Ecology and Systematics, 42:489-512.

30. Renato de Freitas, J. 2000. Yield and N assimilation of winter inoculated wheat rhizobacteria. Pedobiologia, 44: 97-104.
31. Rodelas, B. 1999. Influence of Rhizobium /Azotobacter combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia fabas)*. Biology and Fertility of Soils, 29 (2): 165-169.
32. Sabra, W. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and its role in protecting nitrogenase. Applied and Environmental Microbiology, 66 (9): 4037-4049.
33. Sharma, S.D. and V.P. Bhutani. 1998. Response of apple seedlings to VAM, Azotobacter and inorganic fertilizers. Horticulture Journal, 11(1): 1-8.
34. Sprent, J. I. and P. Sprent.1990. Nitrogen fixing organisms: Pure and Applied Aspects, 2nd eds. London & New York: Chapman and Hall.
35. Steven- son, F. J. 1982. Nitrogen in agricultural soils. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, U.S.A., 940 p.
36. Suba Rao, N.S. 1988. Biofertilizers in agriculture. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, 208 p.
37. Suneja, S., K. Lakshminarayana, P.P. Gupta. 1994. Role of *Azotobacter chroococum* siderophores in control of bacterial rot and *Sclrotinia rot* of mustard. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 24: 202-205.
38. Thompson, J.P., and V.B.D. Skerman. 1979. Azotobacterceae. Academic press INC (Londen), 417p.
39. Tilak, K.V.BR., C.S. Singh, N.K. Roy and Subba N.S. Rao. 1982. *Azospirillum brasilense* and *Azotobacte*r inoculum effect on maize and sorghum. Soil Biology and Biochemistry, 14: 417-418.
40. Viswanthan, R. and R. Samiyappan. 2002. Induced systemic resistance by *pseudomonase fluorescence* against Red rot disease of sugarcane by *colletotrichum falcatum*. Crop protection, 21: 1-10.
41. Weller, D. M. 1983. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. Phytopathology, 73: 1598-1553.
42. Xu, J., L. Ran, X. Luo. 2002. Biological synthesis and application of bacteriocins. Biochimic, 31(3): 211-3.