وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب

روش‌های آزمایشگاهی بررسی ازتوباکتر

هوشنگ خسروی

عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب

نشریه فنی: 636

1402

مشخصات اثر

عنوان: روش‌های آزمایشگاهی بررسی ازتوباکتر

نگارنده: هوشنگ خسروی

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار ادبی: زهرا محمدی

طراح جلد: راضیه محمدی

سال انتشار: 1402

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 64769 در تاریخ 1402/11/4 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 36201900 -026

وب‌سایت: **http://www.swri.ir** پست الکترونیکی: **info@swri.ir**

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارنده است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه 1
نمونه‌برداری خاک برای بررسی ازتوباکتر 2
محیط کشت مناسب برای رشد ازتوباکتر 4
تهیه کشت خالص ازتوباکتر 4
روش‌های برآورد جمعیت ازتوباکتر 5
روش بررسی سلول رویشی و کیست ازتوباکتر 9
روش‌های بررسی و مشاهده تحرک ازتوباکتر 10
روش اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن 10
روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز ویژه ازتوباکتر 11
روش جداسازی گونه *Azotobacter chroococcum* با استفاده از گل اشباع غنی‌شده .. 13
روش جداسازی گونه *Azotobacter chroococcum* با استفاده از لوله آزمایش 14
روش تشخیص *A. chroococcum* بر اساس ریخت‌شناسی 15
روش جداسازی گونه *Azotobacter salinestris* 16
روش جداسازی گونه *Azotobacter vinelandii* 17
روش جداسازی گونه *Azotobacter armeniacus* 17
روش جداسازی گونه *Azotobacter nigricans* 18
روش جداسازی گونه *Azotobacter beijerinckii* 18
روش جداسازی گونه *Azotobacter paspali* 19
روش تشخیص و تفکیک گونه‌های ازتوباکتر با استفاده از منابع کربنی 19
روش تشخیص و تفکیک گونه‌های ازتوباکتر با استفاده از توان تولید رنگ‌دانه 20

روش تفکیک گونه‌های ازتوباکتر با استفاده از رشد در دماهای مختلف 21
رشد گونه‌های مختلف ازتوباکتر در عوامل ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف..... 21
تفکیک گونه‌های مختلف ازتوباکتر ازنظر تاژک و تحرک 23
گونه‌های ازتوباکتر و تثبیت نیتروژن در pHهای مختلف 23
دیگر ویژگی‌های فیزیولوژیک برای تفکیک گونه‌های ازتوباکتر 23
منابع 25

مقدمه

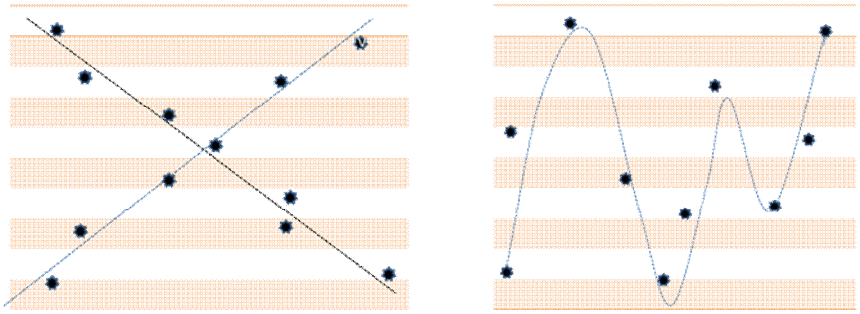
ازتوباکتر یکی از باکتری‌های مفید با ویژگی‌های منحصربه‌فرد است که در خاک، آب و سطح برگ گیاهان می‌تواند وجود داشته باشد؛ بااین‌حال بیشتر در خاک‌های خنثی یا قلیایی یافت می‌شود. توان تثبیت نیتروژن مولکولی، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، تشکیل کیست‌های مقاوم به خشکی و تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی از ویژگی‌های مهم ازتوباکتر است. ازتوباکتر بالاترین میزان تنفس را در بین موجودات زنده دارد. پژوهشگران، ازتوباکتر را یک باکتری بسیار پرکار[1] می‌شناسند که استفاده از آن منجر به پیشرفت‌های اساسی در شناخت فیزیولوژی، بیوشیمی و ژنتیک تثبیت نیتروژن و متابولیسم هیدروژن شده است. پژوهش‌ها نشان داده است که ازتوباکتر در افزایش رشد گیاهان و عملکرد محصولات زراعی و باغی نقش دارد. گونه غالب ازتوباکتر در یک منطقه بستگی به *pH*، دما و مقدار رطوبت خاک دارد. در مناطقی مانند ایران، *Azotobacter chroococcum* و *Azotobacter salinestris* گونه‌های غالب هستند. مطلوب‌ترین حدود رطوبتی خاک برای ازتوباکتر 50 تا 70 درصد ظرفیت مزرعه است. این باکتری، شیمیوارگانوتروف است و ازاین‌رو، کمبود منابع کربنی از عوامل محدودکننده رشد آن محسوب می‌شود به‌طوری‌که جمعیت آن در خاک‌هایی که کود حیوانی در آن‌ها مصرف می‌شود به طور چشمگیری زیادتر است. ازتوباکتر دارای هفت گونه با اشکال سلولی متفاوت و با ابعاد و اندازه‌های مختلفی است به گونه‌ای که جداسازی و شناسایی اولیه آن به نسبت مشکل است و برای تشخیص و تفکیک گونه‌ها نیاز به در کنار هم قرار دادن شاخص‌های تشخیصی مختلفی است. اگرچه مطالبی به‌صورت پراکنده در منابع مختلف ارائه شده است اما تاکنون مجموعه‌ای که دربرگیرنده اطلاعات کافی و جامعی درباره روش‌های مطالعه این باکتری باشد منتشر نشده است. هدف از نگارش این نشریه، ارائه یک کتابچه راهنمای عملی برای مطالعه و بررسی ازتوباکتر از جنبه‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک است.

1. Workhorse

نمونه‌برداری خاک برای بررسی ازتوباکتر

فرم مشخصات نمونه‌برداری برای مطالعات مربوط به ریزجانداران و ازجمله ازتوباکتر در جدول 1 ارائه شده است. برای نمونه‌برداری از لایه رویی خاک تا عمق 60 سانتی‌متری می‌توان استفاده نمود. بااین‌حال در بیشتر خاک‌های کشاورزی و برای مرتعی تا عمق 30 سانتی‌متر مناسب‌تر است. برای نمونه‌برداری خاک، روش‌های زیگزاگی یا قطری پیشنهاد می‌شود (شکل 1).

برای نمونه‌برداری از خاک ریزوسفری، نخست همه ریشه و خاک اطراف آن برداشت و با دقت خاک اطراف ریشه جدا شده و تنها خاکی که به ضخامت حدود چند میلی‌متر و چسبیده به ریشه است نگه داشته می‌شوند. ریشه و خاک چسبیده به آن در سرم فیزیولوژی فرو برده شده و پس از چند دقیقه تکان دادن ظرف و محتویات آن، بقایای ریشه‌ها از آن جدا می‌شود. نمونه‌های خاک، به مدت یک ماه در محیط یخچال قابلیت نگهداری دارند.



شکل 1- الگوی نمونه‌برداری زیگزاگی (راست) و الگوی قطری (چپ)

جدول 1- فرم مشخصات نمونه‌برداری خاک برای مطالعات میکروبیولوژی خاک

ردیف	کد نمونه	آدرس محل نمونه‌برداری	مختصات جغرافیایی محل نمونه‌برداری	عمق نمونه‌برداری	تعداد نمونه برای تهیه نمونه مرکب	وزن نمونه مرکب	وضعیت کشت	نوع گیاه مستقر	وضعیت رطوبت خاک	دمای منطقه هنگام نمونه‌برداری	وضعیت کوددهی مزرعه	تاریخ نمونه‌برداری	نام نمونه‌بردار
			UTM or UPS	(*cm*)		*kg*	دایر، بایر، آیش		خشک، مرطوب، خیس	درجه سلسیوس			
.1													
.2													

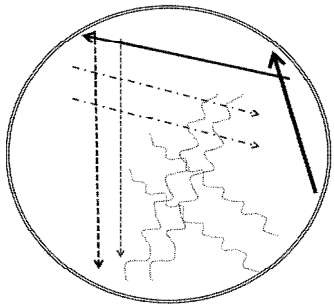
محیط کشت مناسب برای رشد ازتوباکتر

محیط‌های کشت مختلفی برای رشد ازتوباکتر توصیه شده است که بهترین آن‌ها محیط کشت وینوگرادسکی[1] است (خسروی، 1376). ترکیب شیمیایی محیط کشت وینوگرادسکی شامل دو بخش به شرح زیر است: بخش اول به نام محلول وینوگراد شامل فسفات هیدروژن دی پتاسیم، 5 گرم؛ سولفات منیزیم، 2/5 گرم؛ کلرید سدیم، 2/5 گرم؛ سولفات آهنIII، 0/05 گرم و سولفات منگنز، 0/05 گرم در یک لیتر آب مقطر حل و *pH* محیط در حدود 7/3 تنظیم و به‌عنوان محلول ذخیره در یخچال نگهداری می‌شود. بخش دوم؛ محلول عناصر کم‌مصرف شامل: مقدار 0/05 گرم از هر یک از املاح مولیبدات پتاسیم، برات سدیم، نیترات کبالت، سولفات مس و سولفات روی در یک لیتر آب مقطر حل و به‌عنوان محلول ذخیره در یخچال نگهداری می‌شود. محیط کشت نهایی از 50 میلی‌لیتر از محلول وینوگراد، یک میلی‌لیتر محلول عناصر کم‌مصرف، 0/5 گرم کربنات کلسیم، 10 گرم مانیتول و 15 گرم آگار تهیه و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده می‌شود (Kennedy et al., 2015).

تهیه کشت خالص ازتوباکتر

کلنی ازتوباکتر به نسبت درشت و دارای رشد نسبی سریع است؛ همچنین برخی از سویه‌های آن مواد موکوئیدی فراوانی تولید می‌کنند ازاین‌رو، کلنی‌های تشکیل‌شده در کمترین زمان به هم متصل شده و امکان نمونه‌برداری از تک کلنی برای تهیه کشت‌های خالص را نمی‌دهند. برای این منظور، بهتر است خطوط کشت برای خالص‌سازی و تهیه کشت‌های فرعی با فواصل بیشتری نسبت به دیگر باکتری‌ها انجام شود. با توجه به موارد یادشده، برای تهیه کشت خالص از ازتوباکتر، روش خطی[2] درون پلیت با الگوی شکل 2 توصیه می‌شود.

1. Winogradsky
2. Streak-Plate Methods



شکل 2- الگوی کشت خطی مناسب برای تهیه کشت خالص ازتوباکتر

روش‌های برآورد جمعیت ازتوباکتر

برای شمارش تعداد ازتوباکتر و تعیین جمعیت آن با سه روش می‌توان عمل کرد. روش اول، طریقه محتمل‌ترین تعداد (*MPN*)[1] است که روشی آسان برای تعیین تعداد سلول‌های زنده ازتوباکتر در یک نمونه است. برای انجام این روش، نخست 10 گرم از نمونه جامد یا 10 میلی‌لیتر از نمونه مایع در ارلن 250 میلی‌لیتری دارای 90 میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شده و به مدت یک ساعت بر روی شیکر دورانی با سرعت 150 دور بر دقیقه و در دمای 28 درجه سلسیوس قرار داده می‌شود. نمونه به مدت نیم ساعت در حالت سکون قرار داده شده تا ذرات جامد آن رسوب نمایند. برای جداسازی ذرات درشت شناور، سوسپانسیون از کاغذ صافی درشت عبور داده می‌شود. با این شرایط، این رقت برابر 10^{-1} است. رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-5} با اضافه نمودن یک میلی‌لیتر از رقت قبلی به لوله‌های آزمایش دارای 9 میلی‌لیتر محلول ایزوتونیک یا سرم فیزیولوژی (محلول سدیم کلرید 0/85 درصد) تهیه می‌شود. تعداد پنج تکرار لوله آزمایش دارای 5 میلی‌لیتر محیط کشت وینوگرادسکی مایع تهیه می‌شود. یک میلی‌لیتر از هر رقت به هر لوله آزمایش دارای محیط کشت اضافه و کاملاً مخلوط می‌شود. کشت‌ها به مدت یک هفته در دمای 28 تا 30 درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری می‌شوند. هر لوله آزمایش چنانچه دارای ازتوباکتر باشد 2 تا 3 روز پس از کشت، یک لایه سفیدرنگ در سطح رویی لوله تشکیل می‌دهد، لایه سفیدرنگ

1. Most Probable Number

پس از گذشت یک تا دو هفته با توجه به نوع گونه، تغییر رنگ محلول یا نامحلولی ایجاد خواهد کرد. لایه قهوه‌ای تا سیاه، معمولاً دارای گونه‌های *Azotobacter chroococcum* است. چنانچه محیط کشت مایع هم قهوه‌ای شود لایه سطحی ممکن است دارای *Azotobacter salinestris* باشد. تولید رنگ سبز فسفری محلول در آب احتمال وجود گونه *Azotobacter vinelandii* را می‌دهد.

به‌هرحال برای شمارش جمعیت ازتوباکتر، تعداد لوله‌هایی که تشکیل لایه سفیدرنگ را داده‌اند به‌عنوان لوله مثبت در جدول *MPN* در نظر گرفته می‌شوند (جدول 2). برای این منظور، رقتی که بیشترین تعداد لوله مثبت را دارد به‌عنوان گروه اول و تعداد لوله‌های مثبت رقت پیش از آن به ترتیب به‌عنوان گروه وسط و گروه آخر (سه گروه در کنار هم) در نظر گرفته می‌شوند. با استفاده از جدول 2، ضریب *MPN* را قرائت کرده و در عکس رقت مربوط به گروه وسط ضرب می‌شود. به‌عنوان مثال اگر تعداد 5 لوله در رقت 10^{-5}، تعداد 5 لوله در رقت 10^{-6}، تعداد 3 لوله در رقت 10^{-7}، تعداد 1 لوله در رقت 10^{-8} و تعداد صفر (0) لوله در رقت 10^{-9} مثبت شده باشند، آنگاه اعداد گروه اول، وسط و آخر به ترتیب برابر 5، 3 و 1 خواهد بود. با مراجعه به جدول 2، گروه اعداد موردنظر در ردیف 42 جدول قرار دارد و درنتیجه، ضریب *MPN* آن، عدد 1/1 است. حاصل‌ضرب 1/1 در عکس رقت گروه وسط (10^{-7})، برابر تعداد تقریبی سلول‌های زنده ازتوباکتر در نمونه اصلی خواهد بود یعنی $1/1\times10^{7}$ در 10 گرم یا $1/1\times10^{6}$ در گرم خواهد بود.

روش دوم برای تعیین تعداد ازتوباکتر، شمارش کلنی در پلیت[1] و در محیط جامد است. برای این منظور از رقت‌های مختلف تهیه‌شده از کشت اصلی (مانند موارد گفته‌شده بالا)، مقدار 0/1 میلی‌لیتر بر روی پلیت دارای محیط کشت جامد به‌طور یکنواخت و توسط میله شیشه‌ای پخش[2] می‌شود. پلیت‌ها در دمای 30-28 درجه سلسیوس به مدت دو تا پنج روز (با توجه به نوع سویه و سرعت رشد آن) قرار داده و سپس تعداد تک کلنی‌ها شمارش می‌شود.

1. Plate Count
2. Spread Plate

جدول 2- محاسبه محتمل‌ترین تعداد (*MPN*) باکتری‌های زنده (Erkmen, 2021)

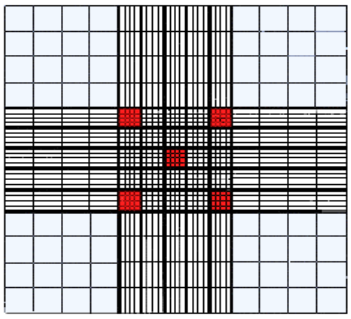
ردیف	تعداد لوله مثبت در			ضریب *MPN* لوله وسط	ردیف	تعداد لوله مثبت در			ضریب *MPN* لوله وسط
	گروه اول	گروه وسط	گروه آخر			گروه اول	گروه وسط	گروه آخر	
1	0	1	0	< 0/01	29	4	3	0	0/27
2	0	0	1	0/02	30	4	3	1	0/33
3	0	1	0	0/02	31	4	4	0	0/34
4	0	2	0	0/04	32	5	0	0	0/23
5	1	0	0	0/02	33	5	0	1	0/31
6	1	0	1	0/04	34	5	0	2	0/43
7	1	1	0	0/04	35	5	1	0	0/33
8	1	1	1	0/06	36	5	1	1	0/46
9	1	2	0	0/06	37	5	1	2	0/63
10	2	0	0	0/05	38	5	2	0	0/49
11	2	0	1	0/07	39	5	2	1	0/70
12	2	1	0	0/07	40	5	2	2	0/94
13	2	1	1	0/09	41	5	3	0	0/79
14	2	2	0	0/09	42	5	3	1	1/10
15	2	3	0	0/12	43	5	3	2	1/40
16	3	0	0	0/08	44	5	3	3	1/80
17	3	0	1	0/11	45	5	4	0	1/30
18	3	1	0	0/11	46	5	4	1	1/70
19	3	1	1	0/14	47	5	4	2	2/20
20	3	2	0	0/14	48	5	4	3	2/80
21	3	2	1	0/17	49	5	4	4	3/50
22	4	0	0	0/13	50	5	5	0	2/40
23	4	0	1	0/17	51	5	5	1	3/50
24	4	1	0	0/17	52	5	5	2	5/40
25	4	1	1	0/21	53	5	5	3	9/20
26	4	1	2	0/26	54	5	5	4	16
27	4	2	0	0/22	55	5	5	5	> 24
28	4	2	1	0/26					

معمولاً اگر تعداد کلنی‌ها بین 30 تا 300 عدد در هر پلیت وجود داشته باشد این مقدار برای رقت موردنظر مناسب به نظر می‌رسد. بااین‌حال با توجه به‌سرعت رشد و اندازه درشت کلنی‌های ازتوباکتر تعداد 20 تا 100 عدد کلنی در رقت انتخابی توصیه می‌شود. جمعیت باکتری در یک محیط بر اساس واحد تشکیل کلنی[1] یا به‌اختصار *cfu* سنجیده می‌شود.

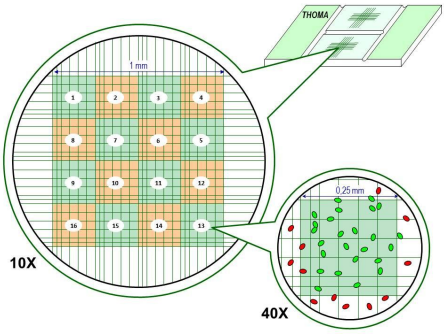
روش سوم برای برآورد جمعیت ازتوباکتر، روش مشاهده مستقیم و شمارش تعداد سلول توسط لام نئوبار هموسیتومتر[2] است. لام نئوبار هموسیتومتر یک لام استاندارد است که دارای دو چاهک به عمق 0/1 میلی‌متر و لامل مخصوص است (شکل 3). هر چاهک متشکل از 9 مربع بزرگ است که هر یک دارای مساحت 0/04 میلی‌متر مربع است. هر مربع بزرگ نیز از 16 مربع کوچک‌تر به مساحت 0/0025 میلی‌متر مربع (0/0025×16=0/04) تشکیل یافته است (شکل 4). برای مطالعه ازتوباکتر با توجه به اندازه سلول آن، در بین مربع‌های نه‌گانه از مربع وسط استفاده می‌شود. در این ناحیه، شمارش در 5 مربع متوسط، ترجیحاً مربع‌های واقع در گوشه‌ها و همچنین مربع وسط انجام‌شده و میانگین آن‌ها محاسبه می‌شود (شکل 5). سلول‌های مشاهده‌شده در درون مربع‌های کوچک و سلول‌های مماس بر خطوط بالایی و سمت چپ مربع‌ها در شمارش لحاظ می‌شود اما سلول‌های مماس بر خطوط پایین و سمت راست محاسبه نمی‌شوند (شکل 5). معمولاً 30 تا 70 عدد سلول، تعداد مطلوب و قابل‌قبول است که چنانچه بیشتر از این تعداد باشد نیاز است نمونه رقیق‌سازی شود. به‌عنوان‌مثال اگر تعداد سلول‌های شمارش‌شده در چهار مربع به ترتیب 60، 75، 65 و 60 عدد باشد میانگین آن‌ها 65 می‌شود. حجم هر مربع بزرگ 0/04×0/1=0/004 میکرولیتر است. ازاین‌رو تعداد سلول در یک میکرولیتر برابر 16250 که حدود $1/6\times10^{7}$ در میلی‌لیتر است.

1. Colony-forming unit
2. Haemocytometer

شکل 3- لام نئوبار هموسیتومتر



شکل 4- مکان‌های مناسب برای شمارش ازتوباکتر بر روی لام نئوبار هموسیتومتر



شکل 5- شبکه‌بندی لام نئوبار هموسیتومتر

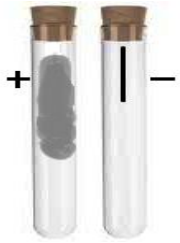
روش بررسی سلول رویشی و کیست ازتوباکتر

به‌طورکلی جنس ازتوباکتر با توجه به مرحله و شرایط رشد دارای دو شکل رویشی و کیست است. هر دو شکل با رنگ‌آمیزی گرم قابل بررسی هستند (Claus, 1992). بااین‌حال چنانچه در مرحله رویشی از آزمایش گرم برای بررسی شکل میکروسکوپی ازتوباکتر استفاده شود برای بررسی مشاهده کیست، روش رنگ‌آمیزی ساده با فوشین کفایت می‌کند.

روش‌های بررسی و مشاهده تحرک ازتوباکتر

تحرک ازتوباکتر را می‌توان به دو روش مشاهده مستقیم و غیرمستقیم بررسی کرد. در روش مستقیم، نخست کشت 24 ساعته ازتوباکتر آماده می‌شود. دو قطره سرم فیزیولوژی یا آب مقطر روی لامل قرار داده می‌شود. با استفاده از لوپ، مقدار اندکی از سطح کلنی برداشته و با قطره فوق مخلوط می‌شود. نمونه حاصل با بزرگنمایی 100 مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه در این روش از مواد رنگی استفاده نمی‌شود ازاین‌رو با تنظیم شدت نور و ایجاد سایه‌روشن می‌توان تحرک باکتری را مشاهده نمود.

در روش غیرمستقیم از لوله‌آزمایش دارای محیط کشت نیمه جامد[1] ازتوباکتر دارای 1/5 گرم در لیتر آگار استفاده می‌شود. با استفاده از لوپ سوزنی در زیر هود لامینار، نمونه ازتوباکتر در مرکز لوله و تا یک‌سوم انتهای لوله در این محیط کشت فرو برده می‌شود. سپس، لوله در گرم‌خانه با دمای $30\ ^oC$ به مدت 48 ساعت قرار داده می‌شود. در صورت متحرک بودن باکتری، افزون بر رشد در خط تلقیح، محیط اطراف این خط نیز رشد واضح و یا کدورت نشان می‌دهد (شکل 6).



شکل 6- بررسی حرکت باکتری به روش محیط نیمه جامد

روش اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن

میزان تثبیت نیتروژن در ازتوباکتر را می‌توان به روش احیای گاز استیلن (C_2H_2) اندازه‌گیری کرد (Postgate, 1972). احیای گاز استیلن توسط آنزیم نیتروژناز، معیاری برای اندازه‌گیری مقدار تثبیت نیتروژن در نظر گرفته شده است. این روش بیشتر جنبه مقایسه‌ای برای تثبیت نیتروژن در سویه‌های مختلف دارد. برای این منظور، نخست لوله‌های آزمایش

1. Semi-solid

15 میلی‌لیتری دارای 5 میلی‌لیتر محیط کشت وینوگرادسکی با سویه موردنظر ازتوباکتر تلقیح شده و پس از 24 ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای 30 درجه سلسیوس درپوش پنبه‌ای با درپوش لاستیکی و غیرقابل نفوذ و استریل تعویض می‌شود. با استفاده از سرنگ، مقدار یک میلی‌لیتر (10 درصد حجم هوای لوله) از هوای لوله‌آزمایش تخلیه و به همان مقدار گاز استیلن بجای آن تزریق می‌شود. برای هر سویه سه تکرار در نظر گرفته می‌شود. لوله‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 30 درجه سلسیوس، گرم‌خانه‌گذاری می‌شوند. سپس 500 میکرولیتر از هوای داخل لوله‌آزمایش به دستگاه کروماتوگرافی گازی[1] (*GC*) تزریق شده و سطح زیر منحنی در نمودار قرائت می‌شود. با تزریق مقادیر 25، 50، 100، 200، 400، 600، 800 و 1000 میکرولیتر از گاز اتیلن به دستگاه منحنی استاندارد ترسیم می‌شود. مقدار اتیلن تولیدشده برچسب نانو مول در میلی‌لیتر محیط کشت در ساعت گزارش می‌شود. هر میکرولیتر اتیلن برابر با 44/64 نانو مول است.

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم *ACC*-دآمیناز ویژه ازتوباکتر

ازتوباکتر در شرایط آزمایشگاهی و در محیط کشت بدون نیتروژن، توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی را دارد. بر این اساس با حذف نیتروژن ترکیبی از محیط کشت نمی‌توان انتظار داشت که ازتوباکتر برای نیاز نیتروژنی خود از ماده 1-آمینوسیکلوپروپان-1-کربوکسیلیک اسید[2] یا به‌اختصار *ACC* استفاده نماید؛ ازاین‌رو برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم *ACC*-دآمیناز در ازتوباکتر روش توصیه‌شده (Penrose and Glick, 2003) نخست لازم است که نیتروژن مولکولی از محیط رشد باکتری حذف شود. برای این منظور از ظروف ارلن شیردار استفاده می‌شود. نخست با استفاده از پمپ خلأ، هوای درون ارلن تخلیه و بجای آن اکسیژن خالص تزریق می‌شود. مقدار 25 میلی‌لیتر محیط کشت استریل وینوگرادسکی دارای 25 میکرولیتر *ACC* نیم مولار و تلقیح شده با سویه مشخص ازتوباکتر به مدت 24 ساعت در دمای $30^{o}C$ در شیکر دورانی قرار می‌گیرد. سوسپانسیون باکتری در لوله درپوش دار (ویال) 1/5 میلی‌لیتری به مدت 10 دقیقه در 8000*g* در دمای 4 درجه سلسیوس رسوب داده می‌شود. رسوب تشکیل‌شده در یک میلی‌لیتر *Tris HCl* 0/1 مولار با *pH* برابر 7/6 سوسپانسیون و در

1. Gas Chromatography
2. ACC-deaminase

16000*g* به مدت 5 دقیقه رسوب داده می‌شود. محلول رویی حذف و رسوب تشکیل‌شده در 600 میکرولیتر *Tris HCl* 0/1 مولار با *pH* برابر 8/5 حل می‌شود. 30 میکرولیتر تولوئن به سوسپانسیون سلولی اضافه و ورتکس می‌شود. 100 میکرولیتر از سلول‌های تولوئنی شده در ویال 1/5 برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین که در ادامه انجام می‌شود در 4 درجه سلسیوس نگهداری می‌شود. دو سری 200 میکرولیتری از سلول‌های تولوئنی شده در ویال‌های 1/5 میلی‌لیتری تهیه می‌شود. به یک ویال، 20 میکرولیتر از محلول *ACC* 0/5 مولار اضافه و مختصری ورتکس و سپس به مدت 15 دقیقه در 30 درجه سلسیوس نگهداری می‌شود. یک میلی‌لیتر *HCl* 0/56 مولار اضافه و مخلوط ورتکس و به مدت 5 دقیقه در *g* 16000 در دمای اتاق سانتریفیوژ می‌شود. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با 800 میکرولیتر *HCl* 0/56 مولار ورتکس می‌شود. 300 میکرولیتر معرف ۲،۴ دی‌نیتروفنیل هیدرازین 0/2 درصد در *HCl* دو نرمال اضافه می‌شود. محتویات پس از ورتکس در 30 درجه سلسیوس به مدت 0/5 ساعت نگهداری می‌شود. 2 میلی‌لیتر سود 2 نرمال اضافه و مقدار جذب در 540 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. در ویال 200 میکرولیتری دوم نیز مقدار جذب اندازه‌گیری و از مقدار جذب نمونه‌ها کسر می‌شود.

برای تهیه منحنی استاندارد آلفاکتوبوتیرات، مقدار 0/05 گرم از نمک سدیمی آلفاکتوبوتیرات در 4 میلی‌لیتر *Tris HCl* 0/1 مولار با *pH* برابر 8/5 حل می‌شود. غلظت این محلول 100 میلی‌مولار است. از این محلول، استاندارد 10 میلی‌مولار تهیه می‌شود. از محلول 10 میلی‌مولار به ترتیب محلول‌های حاوی 1، 0/8، 0/6، 0/4، 0/2 و 0/1 میکرو مول و همچنین استاندارد صفر در حجم 200 میکرولیتر تهیه می‌شود. به هر مجموعه 200 میکرو لیتری از محلول‌های بالا 300 میکرولیتر معرف ۲،۴ دی‌نیترو فنیل هیدرازین 0/2 درصد در اسیدکلریدریک 2 نرمال اضافه و به مدت 30 دقیقه در 30 درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری می‌شود. در طی این مدت آلفاکتوبوتیرات به شکل دی‌فنل هیدرازون درمی‌آید. 2 میلی‌لیتر محلول سود 2 نرمال اضافه و جذب در 540 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. با استفاده از نرم‌افزار مناسب، منحنی استاندارد ترسیم و مقدار جذب و مقدار میکرو مول آلفاکتوبوتیرات محاسبه می‌شود.

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین نمونه‌ها، 100 میکرولیتر از سلول‌های تولوئنی شده که از پیش در 4 درجه سلسیوس نگهداری شده است با استفاده از روش Bradford (1976) با

اندکی تغییرات اندازه‌گیری می‌شود. استانداردهای 0، 0/005، 0/01، 0/03، 0/05، 0/07، 0/09، 0/1 و 0/12 میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی[1] در حجم یک میلی‌لیتر آب مقطر تهیه می‌شود. برای تهیه محلول معرف، 100 میلی‌گرم کوماسی‌بلو *G250* به 50 میلی‌لیتر الکل 96 درجه اضافه و حل می‌شود. 100 میلی‌لیتر اسید فسفریک 85 درصد به محلول اضافه و حجم آن با آب مقطر به یک لیتر رسانده می‌شود. این محلول از کاغذ صافی عبور داده و در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری می‌شود. به تمامی لوله‌های آزمایش استاندارد، مقدار 5 میلی‌لیتر از معرف اضافه می‌شود. مقدار 500 میکرولیتر از معرف به ویال‌های دارای 100 میکرولیتر از سلول‌های تولوئنی شده نیز اضافه می‌شود. در فاصله 10 دقیقه از زمان اضافه نمودن معرف، مقدار جذب نمونه‌ها در 595 نانومتر قرائت می‌شود. مقدار 20 میلی‌لیتر محلول 0/5 مولار 1-آمینوسیکلوپروپان-1- کربوکسیلیک اسید (*ACC*) تهیه و با فیلتر میلی‌پور استریل می‌شود. این محلول در لوله‌های 1/5 میلی‌لیتری استریل و در دمای 22- درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم *ACC*-دآمیناز، محلول *ACC* 0/5 مولار تازه استفاده می‌شود.

روش جداسازی گونه *Azotobacter chroococcum* با استفاده از گل اشباع غنی‌شده

مهم‌ترین گونه ازتوباکتر، *A. chroococcum* است. کروکوکوم به معنای دانه رنگی و متشکل از دو کلمه یونانی کروآ[2] به معنی رنگ و کوکوم[3] یعنی دانه نشأت گرفته است. از ویژگی‌های مهم این‌گونه، تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای تا سیاه نامحلول در آب است. ساده‌ترین روش جداسازی ازتوباکتر از خاک، روش گل اشباع غنی‌شده است. مخلوط خاک و یک درصد نمک پیروات سدیم تهیه و با آب (آب مقطر استریل بهتر است) به حالت گل اشباع رسانده می‌شود. گل اشباع تهیه‌شده به ظرف پتری[4] 7/5 سانتی‌متری منتقل و سطح آن صاف و هموار می‌شود. ظرف پتری 7/5 سانتی‌متری در درون ظرف پتری 14/5 قرارگرفته و درپوش ظرف پتری بزرگ‌تر گذاشته می‌شود. برای جلوگیری از خشک شدن سطح خاک چند میلی‌لیتر آب استریل به کف ظرف پتری بزرگ‌تر اضافه و

1. Bovine Serum Albomin
2. Chroa
3. Coccum
4. Petri dish

در دمای 30 درجه سلسیوس در درون گرم‌خانه نگهداری می‌شود (Becking, 1981). پس از دو هفته در صورت وجود *A. chroococcum*، لکه‌های کرم، قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره مایل به سیاه، روی سطح گل پدید خواهند آمد. شکل کلنی *A. chroococcum* بر روی گل اشباع غنی‌شده با یک درصد پیروات سدیم در شکل 7 نشان داده شده است. از نقاط رنگی روی سطح گل اشباع با ایجاد خراش به‌وسیله حلقه (لوپ)[1]، مقداری از کلنی به ظرف‌های پتری دارای محیط کشت وینوگرادسکی منتقل می‌شود. کشت بر روی ظرف پتری دارای محیط کشت جامد، به روش خطی[2] انجام می‌شود. پس از یک هفته و مشاهده ویژگی‌های ظاهری باکتری و به‌منظور خالص‌سازی آن‌ها از تک کلنی‌های به‌دست‌آمده دوباره کشت‌های فرعی تهیه می‌شود. کلنی تازه دارای شکل رویشی *A. chroococcum* پس از 48 ساعت در شکل 8 نشان داده شده است.

شکل 7- کلنی *A. chroococcum* بر روی گل اشباع (خسروی، 1388)

روش جداسازی گونه *Azotobacter chroococcum* با استفاده از لوله آزمایش

برای جداسازی *A. chroococcum* از خاک به روش لوله آزمایش از سوسپانسیون 10 درصد خاک می‌توان استفاده کرد. برای این منظور، 10 گرم خاک با 90 گرم آب (آب مقطر استریل، بهتر است) در یک ارلن 250 میلی‌لیتری تهیه و به مدت یک ساعت بر روی همزن قرار داده می‌شود. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون به 9 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (کلرید سدیم 0/85 درصد) منتقل می‌شود. از این سوسپانسیون، 1 میلی‌لیتر به 9 میلی‌لیتر محیط کشت مایع وینوگرادسکی منتقل می‌شود. بهتر است چند تکرار از این سوسپانسیون آخر تهیه شود. لوله آزمایش‌های اخیر به مدت یک تا دو هفته در

1. Loop
2. Streaking

دمای 30 درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند. در صورت وجود ازتوباکتر در خاک مورد آزمایش، لایه‌ای بر روی سطح لوله‌های آزمایش تشکیل می‌شود. این لایه در روزهای اول، سفیدرنگ و سپس در ادامه، قهوه‌ای تا سیاه رنگ می‌شوند. با استفاده از لوپ یا سوزن، مقداری از لایه تشکیل‌شده در سطح لوله، نمونه‌برداری شده و به سطح پلیت دارای محیط کشت جامد وینوگرادسکی منتقل و به‌صورت خطی کشت خواهد شد.

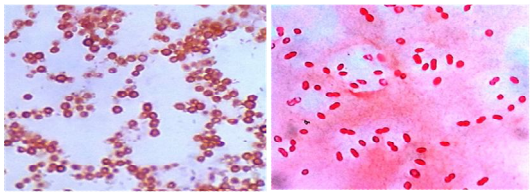
روش تشخیص *A. chroococcum* بر اساس ریخت‌شناسی

در گونه *A. chroococcum*، کلنی‌ها بر روی محیط جامد پس از 24 ساعت ظاهر می‌شوند. کلنی‌های جوان و 48 ساعته این‌گونه، سفید مایل به کرم، غیر شفاف و مات، دارای سطح براق و برآمده هستند (شکل 8). با گذشت زمان به‌تدریج رنگ کلنی به زرد، قهوه‌ای کم‌رنگ تا قهوه‌ای تیره تغییر می‌یابد. در شکل‌های 8 و9 رنگ و شکل کلنی *A. chroococcum* بومی خاک‌های ایران با عمر 2، 3، 4، 6 و 12 روز پس از کشت بر روی محیط کشت وینوگرادسکی نشان داده شده است (شکل‌های 8 و9).

شکل 8- کلنی *A. chroococcum* بومی خاک‌های ایران با عمر 48 ساعت پس از کشت بر روی محیط کشت وینوگرادسکی (خسروی، 1398)

شکل 9- کلنی *A. chroococcum* بومی خاک‌های ایران به ترتیب از چپ به راست؛ سه، چهار، شش و دوازده روز پس از کشت (خسروی، 1398)

همزمان با تغییر رنگ کلنی، شکل‌های میکروسکوپی سلول نیز تغییر می‌یابند. سلول رویشی در کشت‌های جوان و حالت کیست در کشت‌های قدیمی‌تر مشاهده می‌شود. سلول رویشی و کیست *A. chroococcum* با بزرگنمایی 1000 برابر در شکل 10 نشان داده شده است (خسروی، 1398).



الف ب

شکل 10- سلول رویشی *A. chroococcum* (الف) و کیست *A. chroococcum* (ب)؛ (خسروی، 1398)

روش جداسازی گونه *Azotobacter salinestris*

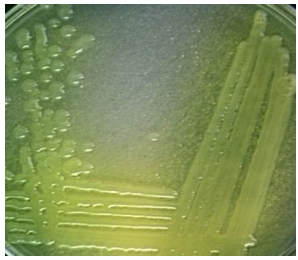
همان‌طورکه پیش‌ازاین اشاره شد *A. chroococcum* تنها گونه ازتوباکتر است که در محیط کشت جامد رنگ‌دانه قهوه‌ای نامحلول در آب تولید می‌کند. ولی گونه *A. salinestris* در محیط مایع، رنگ‌دانه قهوه‌ای محلول در آب تولید می‌کند (شکل 11).

شکل 11- تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای محلول در آب توسط A. salinestris (چپ) در مقایسه با محیط کشت شاهد (راست)؛ (خسروی، 1398)

برای جداسازی *A. salinestris* از خاک به روش لوله آزمایش همانند روش برای *A. chroococcum* عمل می‌شود. برای این‌گونه نیز لایه‌ها در روزهای اول، سفیدرنگ و سپس در ادامه رشد زرد یا کرم‌رنگ می‌شوند اما محیط مایع ممکن است قهوه‌ای رنگ شود.

روش جداسازی گونه *Azotobacter vinelandii*

سلول‌های گونه *A. vinelandii* همانند *A. chroococcum* هستند اما مانند *A. chroococcum* قهوه‌ای نمی‌شوند. کیست در کشت‌های کهنه و یا پس از افزودن بوتانول به محیط کشت دیده می‌شود. رنگ‌دانه فلورسنت سبز-زرد محلول در آب که یک نوع سیدروفور به نام ازتوباکتین است از ویژگی‌های مهم این گونه است (شکل 12). غنی‌سازی[1] محیط کشت و استفاده از سوبستراهای آلی به‌عنوان منبع کربن، اساسی برای جداسازی گونه‌های *Azotobacter* است. در بین گونه‌های *Azotobacter* فقط *A.vinelandii* می‌تواند از رامنوز و فنل به‌عنوان منبع کربن استفاده کند. اگر محیط کشت ازتوباکتر با یکی از منابع کربنی ال-رامنوز، اتیلن گلیکول، اری‌تریتول، دی-آرابیتول غنی شود و از سوی دیگر، بنزوات سدیم یک درصد یا فنل 0/1 درصد به‌عنوان بازدارنده از رشد دیگر گونه‌های ازتوباکتر به محیط اضافه می‌شود. پس از گرم‌خانه‌گذاری در دمای 37 درجه سلسیوس، تنها گونه *A. vinelandii* رشد خواهد کرد (Kennedy et al., 2015).



شکل 12- کلنی A. vinelandii

روش جداسازی گونه *Azotobacter armeniacus*

ریخت‌شناسی گونه *A. armeniacus* شبیه دیگر گونه‌های ازتوباکتر است. تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای تیره تا قرمز مایل به بنفش محلول در آب از ویژگی‌های این‌گونه است. از ویژگی‌های ممتاز این‌گونه، ناتوانی مصرف نیترات و آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن است. گونه *A. armeniacus*، اوره‌آز مثبت است. روش غنی‌سازی[2] محیط کشت با کاپریلات برای

1. Enrichment
2. Enrichment

جداسازی *A. armeniacus* مناسب است. در این شرایط افزون‌بر این‌گونه، *Azotobacter vinelandii* هم رشد می‌کند که برای تمایز این دو از ویژگی‌های دیگر آن‌ها همانند رنگ‌دانه سبز-زرد که مربوط به *A. vinelandii* و رنگ‌دانه قهوه‌ای سیاه تا قرمز بنفش محلول در آب برای گونه *A. armeniacus* استفاده می‌شود (Kennedy et al., 2015).

روش جداسازی گونه *Azotobacter nigricans*

گونه *A. nigricans* نیز ازنظر ریخت‌شناسی شبیه دیگر گونه‌های ازتوباکتر بوده اما بدون تاژک و غیرمتحرک است. سطح کلنی‌ها در بیشتر سویه‌های این گونه صاف و مات بوده اما برخی از آن‌ها هم نیمه شفاف هستند. رنگ‌دانه‌های تولیدی معمولاً قرمز مایل به بنفش هستند. گونه *A. nigricans* در 37 درجه رشد ندارد و یا بسیار کم رشد می‌کند. این‌گونه توان مصرف نیترات و آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن را دارد. گونه *A. nigricans* دارای دو زیرگونه *achromogenes* و *nigricans* است. سلول‌های کهنه زیرگونه *nigricans* معمولاً رنگ‌دانه قهوه‌ای تیره محلول در آب تولید می‌کنند. درحالی‌که در زیرگونه *achromogenes* فقط رنگ‌دانه زرد یا دارچینی غیرقابل‌انتشار در درون کلنی ایجاد می‌شود. برای جداسازی گونه *A. nigricans* تاکنون روش غنی‌سازی ویژه‌ای ارائه نشده است (Kennedy et al., 2015).

روش جداسازی گونه *Azotobacter beijerinckii*

ریخت‌شناسی گونه *A. beijerinckii* بستگی به شرایط کشت داشته و خیلی شبیه *A. chroococcum* است. سلول‌ها بدون تاژک و غیرمتحرک هستند. این‌گونه نیز توان مصرف نیترات و آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن را دارد. دو زیرگروه برای گونه *A. beijerinckii* تعریف شده که یکی زیرگروه محتمل به اسید و دیگری زیرگروه شناخته شده با حساسیت به فنل 0/05 درصد یا 40 میلی‌گرم در میلی‌لیتر فوشین الماس[1] است. گونه *A. beijerinckii* توانایی استفاده از سوربیتول یا اکونیتات به‌عنوان منبع کربن را ندارد. این‌گونه همچنین توان تولید هوموپلی‌ساکاریدهای قابل پخشیدگی[2] را ندارد. محیط کشت ازتوباکتر با یکی از منابع کربنی ال-تارتارات، آلفا-هیدروکسی بنزوات، دی-

1. Diamond fuchsin
2. Diffusible

گلوکورونات یا دی-گالاکتورونات غنی‌سازی می‌شود. تنظیم *pH* محیط کشت در حدود 5/5 تا 6 برای رشد و جداسازی این‌گونه مناسب است.

روش جداسازی گونه *Azotobacter paspali*

گونه *A. paspali* با گیاه *پاسپالوم نوتاتوم* واریته باتاتایس[1] دارای رابطه همیاری است و تاکنون فقط از ریشه این گیاه جداسازی شده است. سلول‌های این‌گونه دارای ریخت‌شناسی مشابه دیگر گونه‌های جنس ازتوباکتر هستند بااین‌حال در مرحله رشد نمایی[2]، سلول‌ها طویل‌تر و گاهی تا 60 میکرومتر هستند. سلول‌های گونه *A. paspali* توسط تاژک‌های پریتریشوس (تاژک‌هایی که تمام سطح سلول را پوشیده‌اند)، حرکت می‌کنند. کلنی‌ها برآمده با تحدب غیر یکسان، کَره‌ای با سطح صاف یا کدر و مات با لبه کامل یا لوله شده دیده می‌شوند. گونه *A. paspali* توان مصرف آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن را داشته اما توانا به مصرف گلوتامات به این منظور نیست. گونه *A. paspali* توانا به استفاده از نیترات به‌عنوان منبع نیتروژن بوده اما فاقد توان تولید نیتریت است. این‌گونه همانند گونه *A. vinelandii* رنگ‌دانه سبز-زرد محلول در آب تولید می‌کند. اساساً اگر نمونه از خاکی که در آن گیاه *پاسپالوم نوتاتوم* کشت نشده باشد این‌گونه با این رنگدانه، *A. vinelandii* خواهد بود. در گونه*A. paspali*، کلنی‌ها پس از 24 ساعت، با چشم غیرمسلح قابل مشاهده نبوده و فقط پس از 48 ساعت ظاهر می‌شوند. در این گونه در صورت وجود برم تیمول‌بلو در محیط کشت، به علت اسیدی شدن، رنگ محیط زرد می‌شود (Kennedy et al., 2015).

روش تشخیص و تفکیک گونه‌های ازتوباکتر با استفاده از منابع کربنی

گونه‌های مختلف ازتوباکتر می‌توانند دامنه وسیعی از منابع کربنی را مصرف کنند. همه گونه‌های ازتوباکتر توانا به مصرف گلوکز، فروکتوز، استات، پیرووات، فومارات، مالات، سوکسینات، لاکتات، اکسوگلوتارات، دی‌ال-گلوتارات و استیل متیل کربینول هستند؛ اما برخی گونه‌ها نمی‌توانند برخی از منابع کربنی را مصرف کنند که این موضوع می‌تواند

1. Paspalum notatum cv. Betatais
2 .Exponential phase

مبنایی برای تفکیک گونه‌ای استفاده شود. در جدول 3 منابع کربنی قابل استفاده توسط گونه‌های مختلف ازتوباکتر نشان داده شده است (Kennedy et al., 2015).

روش تشخیص و تفکیک گونه‌های ازتوباکتر با استفاده از توان تولید رنگ‌دانه

گونه‌های مختلف ازتوباکتر رنگ‌دانه‌های محلول در آب با رنگ‌های متفاوتی تولید می‌کنند. در جدول 4 توان تولید رنگدانه توسط گونه‌های ازتوباکتر نشان داده شده است.

جدول 3- منابع کربنی قابل‌استفاده توسط گونه‌های مختلف ازتوباکتر

ردیف	نوع منبع کربنی	نوع گونه ازتوباکتر						
		کروکوکوم	آرمنیاکو	بیجرینکی	نیگریکانس	پاسپالی	سالینستریس	وینلاندی
1.	ساکارز	+	+	+	+	+	+	+
2.	پروپیونات	+	d	+	-	-	+	+
3.	مانیتول	+	+	d	d	-	+	+
4.	بتافنیل پروپیونات	d	-	-	-	-	d	+
5.	ان-بوتیرات	+	+	+	d	-	+	+
6.	بنزوات	d	-	+	-	-	d	+
7.	ترهالوز	+	+	d	+	-	+	-
8.	ملوبیوز	+	+	+	d	-	+	+
9.	مالتوز	+	+	d	d	-	+	+
10.	رافینوز	+	d	d	d	-	+	d
11.	گلیسرول	d	-	d	-	-	d	+
12.	سوربیتول	+	+	d	d	-	+	+
13.	دی-گلوکورانات	-	-	+	-	-	-	+
14.	دی-گالاکتورونات	-	+	+	-	-	-	-
15.	گلوتارات	-	d	-	-	-	-	+
16.	گلیکولات	-	-	-	-	-	-	+
17.	فنل	-	-	d	-	-	-	+
18.	رامنوز	-	-	-	-	-	-	+
19.	کاپرات	+	-	-	-	-	+	+
20.	کاپریلات	-	+	-	-	-	-	+
21.	مزو-اینوسیتول	-	+	+	-	-	-	+
22.	مالونات	+	-	-	d	-	+	+
23.	پروپان-1-اُل	-	-	d	d	-	-	+
24.	نشاسته هیدرولیز شده	+	+	d	d	-	+	-

+: همه سویه‌ها واکنش می‌دهند؛ -: هیچ سویه‌ای واکنش نمی‌دهد؛ d: سویه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی می‌دهند.

جدول 4- نوع رنگ‌دانه محلول در آب، تولیدی توسط گونه‌های مختلف ازتوباکتر

ردیف	رنگ‌دانه	نوع گونه						
		کروکوکوم	آرمنیاکو	بیجرینکی	نیگریکانس	پاسپالی	سالینستریس	وینلاندی
1.	سبز-زرد فلورسنت	-	-	-	-	+	-	+
2.	قهوه‌ای سیاه	-	-	-	*d*	-	+	-
3.	قهوه‌ای سیاه تا قرمز بنفش	-	+	-	+	-	-	-
4.	قرمز بنفش	-	+	-	*d*	+	-	*d*

+: همه سویه‌ها واکنش می‌دهند؛ -: هیچ سویه‌ای واکنش نمی‌دهد؛ *d*: سویه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی می‌دهند.

روش تفکیک گونه‌های ازتوباکتر با استفاده از رشد در دماهای مختلف

گونه‌های ازتوباکتر در دماهای مختلف دارای رشد متفاوتی هستند. توان رشد در دماهای مختلف توسط گونه‌های مختلف ازتوباکتر در جدول 5 نشان داده شده است.

جدول 5- رشد گونه‌های مختلف ازتوباکتر در دماهای مختلف

ردیف	دما (درجه سلسیوس)	نوع گونه						
		کروکوکوم	آرمنیاکو	بیجرینکی	نیگریکانس	پاسپالی	سالینستریس	وینلاندی
1.	9	-	-	*d*	*d*	-	-	-
2.	14	*d*	-	+	*d*	+	-	+
3.	18	+	*d*	+	+	+	-	+
4.	32	+	+	+	+	+	*d*	+
5.	37	*d*	*d*	-	-	+	+	+

+: همه سویه‌ها واکنش می‌دهند؛ -: هیچ سویه‌ای واکنش نمی‌دهد؛ *d*: سویه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی می‌دهند.

رشد گونه‌های مختلف ازتوباکتر در عوامل ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

رشد گونه‌های مختلف ازتوباکتر در عوامل ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدول 6 نشان داده شده است.

جدول 6- رشد در عوامل ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

ردیف	عامل ضد میکروبی	مقدار	نوع گونه						
			کروکوکوم	آرمنیاکو	بیجرینکی	نیگریکانس	پاسپالی	سالینستریس	وینلاندی
1.	استرپتومایسین	0/2 میکروگرم در میلی‌لیتر	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
2.	تتراسایکلین	2 میکروگرم در میلی‌لیتر	*d*	مقاوم	*d*	*d*	مقاوم	*d*	*d*
3.	کلرام‌فنیکل	25 میکروگرم در میلی‌لیتر	*d*	*d*	*d*	مقاوم	*d*	مقاوم	مقاوم
4.	سولفانیل آمید	25 میکروگرم در میلی‌لیتر	*d*	مقاوم	*d*	*d*	حساس	*d*	*d*
5.	پنی‌سیلین *G*	5 واحد در میلی‌لیتر	*d*	حساس	*d*	مقاوم	مقاوم	*d*	*d*
6.	اریترومایسین	2 میکروگرم در میلی‌لیتر	حساس	مقاوم	*d*	مقاوم	*d*	حساس	مقاوم
7.	نئومایسین	1 میکروگرم در میلی‌لیتر	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
8.	کانامایسین	1 میکروگرم در میلی‌لیتر	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
9.	فنل	0/05 درصد	مقاوم	حساس	*d*	*d*	*d*	*d*	مقاوم
10.	بنزوات سدیم	0/5 درصد	*d*	مقاوم	*d*	مقاوم	*d*	*d*	مقاوم
11.	فلورید سدیم	0/01 مولار	*d*	مقاوم	مقاوم	*d*	مقاوم	*d*	مقاوم
12.	کلرید جیوه	10 میکروگرم در میلی‌لیتر	*d*	مقاوم	*d*	*d*	مقاوم	*d*	*d*
13.	یدواستات	1 میلی‌مولار	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس

+: همه سویه‌ها واکنش می‌دهند؛ -: هیچ سویه‌ای واکنش نمی‌دهد؛ *d*: سویه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی می‌دهند.

تفکیک گونه‌های مختلف ازتوباکتر ازنظر تاژک و تحرک

ویژگی‌های گونه‌های ازتوباکتر ازنظر وضعیت تاژک و تحرک در جدول 7 نشان داده شده است.

جدول 7- ویژگی‌های گونه‌های مختلف ازتوباکتر ازنظر وضعیت تاژک و تحرک

ردیف	ویژگی‌ها	نوع گونه						
		کروکوکوم	آرمنیاکو	بیجرینکی	نیگریکانس	پاسپالی	سالینستریس	وینلاندی
1.	تحرک	+	+	-	-	+	+	+
2.	تاژک‌های پریتریشوس	+	+	-	-	+	+	+

گونه‌های ازتوباکتر و تثبیت نیتروژن در pH های مختلف

تثبیت نیتروژن توسط گونه‌های مختلف ازتوباکتر در *pH* های مختلف در جدول 8 نشان داده شده است.

جدول 8- تثبیت نیتروژن توسط گونه‌های مختلف ازتوباکتر در *pH*های مختلف

ردیف	*pH*	نوع گونه						
		کروکوکوم	آرمنیاکو	بیجرینکی	نیگریکانس	پاسپالی	سالینستریس	وینلاندی
1.	5-5/5	-	-	*d*	*d*	-	-	-
2.	6	-	-	+	*d*	*d*	*d*	+
3.	6/5-9/5	+	+	+	+	+	+	+
4.	10	+	*d*	+	+	+	-	+

+: همه سویه‌ها واکنش می‌دهند؛ -: هیچ سویه‌ای واکنش نمی‌دهد؛ *d*: سویه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی می‌دهند.

دیگر ویژگی‌های فیزیولوژیک برای تفکیک گونه‌های ازتوباکتر

برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک دیگر برای تفکیک گونه‌های ازتوباکتر در جدول 9 نشان داده شده است.

جدول 9- ویژگی‌های گونه‌های مختلف از توباکتر

ردیف	ویژگی‌ها	نوع گونه						
		کروکوکوم	آرمنیاکو	بیجرینکی	نیگریکانس	پاسپالی	سالینستریس	وینلاندی
1.	پراکسیداز	*d*	*d*	*d*	*d*	-	+	+
2.	اوره‌آز	+	+	+	+	+	+	+
3.	اکسیداز	+	*d*	+	+	+	*nd*	+
4.	احیاء نیترات به نیتریت	+	-	+	+	-	+	+
5.	تولید H_2S از تیوسولفات	*d*	-	*d*	*d*	+	*nd*	+
6.	تولید H_2S از سیستئین	-	-	-	-	*d*	*nd*	*d*
7.	تولید پلی‌ساکاریدهای قابل پخشیدگی	+	*d*	*d*	+	-	*d*	*d*

+: همه سویه‌ها واکنش می‌دهند؛ -: هیچ سویه‌ای واکنش نمی‌دهد؛ *d*: سویه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی می‌دهند.

منابع

خسروی، ه. 1376. بررسی فراوانی و انتشار ازتوباکتر کروکوکوم در خاک‌های زراعی استان تهران و مطالعه برخی از خصوصیات فیزیولوژیک آن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، 111 صفحه.

خسروی، ه. 1388. دستیابی به دانش فنی تولید کود بیولوژیک ازتوباکتر برای مزارع گندم. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، نشریه شماره 1450، 24 صفحه.

خسروی، ه. 1398. بررسی پتانسیل باکتری‌های ازتوباکتر بومی بر رشد ذرت در شرایط تنش خشکی. مؤسسه تحقیقات خاک و آب. شماره ثبت 56201، تاریخ ثبت: 1398/7/1.

Becking, J.H. 1981. The family Azotobacteraceae. In: The prokaryotes-a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Ballows A, Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. (Eds). Springer, Heidelberg, 795–817.

Claus, D. 1992. A standardized Gram staining procedure. Technical Information Sheet No. 9. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 8: 451–452.

Erkmen, O. 2021. Microbiological analysis of foods and food processing environments. Academic Press. Elsevier Science, 600 p.

Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M.L. and Melton, T. 2015. Azotobacter. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Pp.1-33.

Page, W.J. and Shivprasad, S. 1991. Azotobacter salinestris sp. nov., a Sodium-Dependent, Microaerophilic, and Aeroadaptive Nitrogen-Fixing Bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 41(3): 369-376.

Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum, 118(1): 10-15.

Postgate, J.R. 1972. Chapter XIII the acetylene reduction test for Nitrogen fixation. Methods in Microbiology, 6: 343-356.