مجله علوم كشاورزي ايران
جلد ۳۷، شماره ۵، سال ۱۳۸۵ (۹۴۹-۹۴۳)

جداسازي، شناسايي و اندازه‌گيري ميزان تثبيت بيولوژيك نيتروژن در *Gluconacetobacter diazotrophicus*

محسن علمائي
استاديار دانشگاه كشاورزی و منابع طبيعی گرگان
(تاريخ دريافت: ۸۳/۴/۸ - تاريخ تصويب: ۸٤/۱/۲٤)

چكيده

براي نيل به خودكفايي در تامين شكر، سطح زيركشت نيشكر و متعاقب آن مصرف كودهاي شيميايي ازتي در استان خوزستان افزايش يافته كه اين مسئله آلودگي محيط زيست را به دنبال خواهد داشت. بنابر اين استفاده از باكتريهاي تثبيت كننده نيتروژن به منظور كاهش آلودگي محيط زيست و تامين بخشي از نياز نيتروژن نيشكر ضروري و مفيد به نظر مي‌رسد. باكتري هميار تثبيت كنندة نيتروژن در نيشكر از گونه ***Gluconacetobacter diazotrophicus*** مي‌باشد كه كاملاً درون بافتي بوده و در خاك زنده نمي ماند و جداسازي آن باعصاره گيري از بافت صورت مي‌گيرد. تعداد ۵ جدايه بومي و ۳ سويه وارداتي از باكتري در اين تحقيق مورد مطالعه قرار گرفتند. باكتري در محيط استاندارد جامد **LGIP** كلنيهاي نارنجي تا قرمز رنگ ايجاد مي‌كندكه در كشت كهنه قهوه‌اي رنگ مي‌شوند. در محيط كشت جامد سيب‌زميني كلنيهاي سفيد رنگ ايجاد مي‌شوند كه پس از ده روز به رنگ قهوه‌اي سوخته در مي‌آيند. در محيط جامد گلوكز- عصاره مخمر- كربنات كلسيم (**GYC**) ايجاد كلنيهاي قهوه‌اي به همراه رنگدانة قهوه‌اي محلول در آب مي‌نمايد. باكتري در غلظت بالاي گلوكز (۳۰%) قادر به رشد است و توليد اسيد استيك مي‌نمايد. اين باكتري اكسيداز و نيترات رداكتاز منفي و كاتالاز مثبت مي‌باشد. از اكسيداسيون الكل توليد اسيد مي‌نمايد ولي مرحله بعدي اكسيداسيون را انجام نمي دهد. اين باكتري داراي توان تثبيت بيولوژيك نيتروژن ميباشد كه در جدايه هاي مختلف از ۲۵۷-۲۱۰ نانومول اتيلن در ميلي ليتر.ساعت با روش احياي استيلن(**ARA**) اندازه‌گيري گرديد.

واژه‌هاي كليدي: نيشكر، تثبيت بيولوژيك نيتروژن، اندوفيت اجباري، *Gluconacetobacter diazotrophicus*

مقدمه

نيشكر *(Saccharum officinarum)* جزء گياهان C_4 بوده و در مناطق گرمسيري و نيمه‌گرمسيري كشت مي‌شود (٦). اين گياه مانند ساير گياهان چهار كربنه از انرژي نوراني و گرمايي خورشيد حداكثر بهره را مي‌برد. نيشكر و چغندر در مقايسه با ساير محصولات كشاورزي از نقطه‌نظر راندمان تثبيت انرژي در واحد سطح در درجه اول اهميت قرار دارند. محصول شكر و صنايع جانبي فراوان و با اهميت آن مثل خوراك دام، نئوپان، الكل، كاغذ، خمير مايه، نيشكر را به يك محصول راهبردي تبديل كرده است. كشورهاي جهان سوم مثل كشور ما با بحران جدي در زمينه كشاورزي وتأمين غذا براي مردم روبرو هستند. بنابر گزارش نمايندة FAO در جمهوري اسلامي آيران تعداد ۸٤۰ ميليون نفر در جهان به گرسنگي مزمن دچار هستند كه ۸۰۰ ميليون نفرآنها در كشورهاي درحال توسعه مي‌باشند. با توجه به نياز كشور به قريب دو ميليون تن شكر در سال (مصرف سرانه ۳۰ كيلوگرم) و جلوگيري از واردات آن و خروج ارز، كشت اين محصول دركشور سزاوار توجه بيشتر مي‌باشد (۵). مساعد بودن جلگه خوزستان با آب و هواي نيمه‌استوايي و آب سطحي

E-mail: olamaee_m@yahoo.com

فراوان لزوم گسترش كشت نيشكر را در اين استان توجيه مي‌كند. طرح توسعه نيشكر و صنايع جانبي نيشكر قصد دارد حدود ٧٠ هزار هكتار از اراضي بهسازي شده در شمال و جنوب استان خوزستان را به زير كشت برد تا كشور به مرزهاي خودكفايي در توليد شكر نزديك گردد. در سال ١٣٨٥ با راه‌اندازي پنج كارخانه توليد شكر در طرح توسعه نيشكر و صنايع جانبي و سه واحد نيشكر كارون، هفت تپه و ميان آب، افزون بر ٦٠٠ هزار تن شكر در خوزستان توليد مي‌شود و با توجه به نياز آبي زياد و توليد بالاي نيشكر در كشور($ton\ ha^{-1}$ ١٠٠) و نياز زياد نيشكر به كود ازتي با تأمين بخشي از نياز ازتي آن توسط كودهاي بيولوژيك مي‌توان از افزايش نيترات در زهاب آب آبياري جلوگيري نمود. طبق گزارش جعفرنژادي و ملكوتي (٣) ميزان نيترات در زهاب مزارع هفت تپه ٦٢ ميلي‌گرم در ليتر گزارش شده كه حد خطرناكي است. امروزه نقش نيترات براي سلامتي انسان از جهات مختلفي قابل بررسي است. ايجاد بيماري مت‌هموگلوبينميا[1] در نوزادان و نيز سرطانزايي در بزرگسالان با مقدار نيترات موجود در آب آشاميدني و مواد غذايي ارتباط مستقيم دارد (٧ ، ٤). براي افزايش توليد محصول پرنيازي مثل نيشكر در واحد سطح ميتوان با مديريت صحيح و دقيق در مصرف كود شيميايي و جايگزيني بخشي از آن توسط كود بيولوژيك از آلودگي محيط زيست جلوگيري نمود (١، ٢). باكتري تثبيت كننده ازت در نيشكر در صورت مهيا بودن فسفر، پتاسيم و ديگر عناصر ريزمغذي توانايي تامين ٣٠% از ازت مورد نياز گياه را دارا مي‌باشد و بيشترين مقدار تثبيت ازت در نيشكر $150\ kg\ ha^{-1}$ گزارش شده است (١٥). مطالعه بر روي باكتري‌هاي تثبيت كننده ازت در غلات از چند دهه قبل آغاز شده و اين باكتريها به دو گروه اندوفيت اختياري[2] و اجباري[3] تفكيك شده اند. باكتري‌هاي اختياري تثبيت كننده ازت در نيشكر از جنس *Azospirillum* و انواع اجباري از جنس‌هاي *Burkholderia, Herbaspirillum* و *Acetobacter* معرفي شده اند (٨,٩). اولين بار Dobereiner و Ruschel (١٩٥٨) از بافت نيشكر يك نوع باكتري همبار تثبيت كننده ازت را جداسازي و آن را *Beijerinckia fluminensis* نامگذاري نمودند. كاوالكنت و دوبرنير (١٩٨٨) گونة اختصاصي *Acetobacter diazotrophicus* را براي نيشكر شناسايي نمودند، اين گونه توسط يامادا و همكاران (١٩٩٧) به گونة *Gluconacetobacter diazotrophicus* تغيير نام يافت. اين باكتري علاوه بر نيشكر در سيب‌زميني و سورگوم شيرين نيز يافت مي‌شود و به حالت همزيست اجباري در تمام قسمتهاي بافتهاي گياهي وجود دارد و در خاك زنده نمي‌ماند. باكتري ميله‌اي كوتاه، گرم منفي، هوازي اجباري و هتروتروف مي‌باشد. درجه حرارت مطلوب براي رشد آن ٣٠°C -٢٥ و مناسب‌ترين pH براي آن ٥/٥ مي‌باشد. در $pH \geq 7$ قادر به رشد نيست اما در pH كمتر از ٣ و در غلظت بالاي نيترات (٢٥mM) هم تثبيت ازت را انجام مي‌دهد (١١). برخي از سويه‌هاي استوباكتر توانائي توليد اكسين (IAA)[4]را دارا مي‌باشند (١٦).

با توجه به مصرف $300-350\ kg.ha^{-1}$ كود اوره در اراضي زير كشت نيشكر خوزستان، مي‌توان با جايگزيني بخشي از كود ازتي مورد نياز نيشكر توسط كود بيولوژيك قدم‌هايي در جهت كشاورزي پايدار و كاهش آلودگي محيط زيست برداشت.

مواد و روش‌ها

براي جداسازي باكتري استوباكتر از اراضي زير كشت نيشكر در استان خوزستان در اواخر فروردين سال ١٣٨٢ از واريته‌هاي مختلف كند رشد و تند رشد نيشكر نمونه‌برداري صورت گرفت. مختصات جغرافيايي ١٥ نقطه نمونه‌گيري شده در شمال و جنوب استان ثبت گرديد. از هر مزرعه يك ساقه مربوط به هر واريته انتخاب و به آزمايشگاه منتقل گرديد. براي استريل سطحي ساقه ابتدا ساقه هاي ١٠ سانتيمتري نيشكر از واريته‌هاي مختلف، به مدت ١٥ دقيقه در محلول ١% كلروآمين‌تي[5] قرار داده شدند و در زير لامينار پس از ٤ بار شستشو با آب مقطر در دستگاه خردكن ضدعفوني شده با الكل ٩٦ درصد خرد شده و بر روي پارچه استريل عصاره گيري شدند. ٠/١ ميلي‌ليتر از عصاره بدست آمده به لوله‌هاي حاوي

1. Methemoglobinemia
2. Facultiative endophyte
3. Obligate endophyte
4. Indol-3-acetic acid
5. Chloramin - T

0ml محيط نيمه جامد استريل LGIP حاوي ١٠٠ ميلي‌گرم در ليتر قارچكش سيكلوهگزامايد[1] اضافه شد. لوله‌ها به مدت ٣ الي ٤ روز در انكوباتور با دماي ٣٠° C نگهداري شدند و هاله‌اي نارنجي رنگ در سطح محيط تشكيل گرديد.

تركيب محيط LGIP بدين شرح است: LGIP $g.l^{-1}$ (K_2HPO_4 0.2, KH_2PO_4 0.6, $MgSO_4$. $2H_2O$ 0.2, $CaCl_2$. $2H_2O$ 0.02, $FeCl_3$. $6H_2O$ 0.01, $(NH_4)_2$ SO_4 0.132 , $Na_2MoO_4.2H_2o$ 0.002, Sucrose 100, Agar 2.0) Bromotymol blue[2] 5 ml

پ‌هاش محيط با اسيداستيك بر روي 0/5 تنظيم گرديد.

كشت بر روي محيط جامد **GYC**[3]

جهت شناسايي گونه *G. diazotrophicus* تك كلنيهاي رشد كرده بر روي محيط LGIP بر روي محيط GYC Agar (1.5%, pH=5.5 with Acetic acid) ، $CaCO_3$ 3% ، (Glucose 5% ، Yeast extract 1%) برده شد.

چگونگي رشد در محيط كشت مايع گلوكز ٣٠ درصد

براي اين منظور ابتدا براي جلوگيري از كاراميله شدن گلوگز مقدار ٣٠ml از گلوكز ٤٠% را توسط فيلتر سلولزي (٤µm) استريل نموده و در هر لوله استريل ٣ml ريخته و سپس از بقيه تركيبات محيط LGIP با ٤ برابر غلظت به مقدار ١ml به هر لوله اضافه شد تا غلظت نهايي قند در محيط به٣٠ درصد برسد. هر لوله توسط سوسپانسيون كشت تازه (٤٨ ساعت رشد) از هر جدايه با لوپ تلقيح گرديد. براي اطمينان از عدم آلودگي، از هر نمونه به صورت نقطه‌اي بر روي محيط GYC جامد كشت داده شد.

كشت بر روي محيط سيب‌زميني

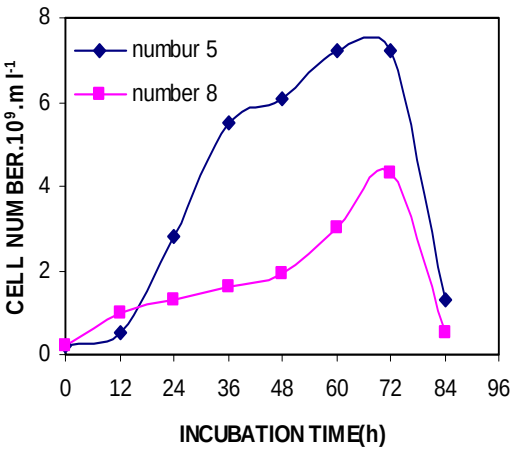
مقدار ٢٠٠ گرم سيب‌زميني را تكه تكه كرده و تا مرحله پخته شدن در كمتر از يك ليتر آب مقطر جوشانده و عصاره آن را صاف و تركيبات زير به آن اضافه و به حجم يك ليتر رسانده شد.

(Yeast extract 2gr; Sucrose 100gr ; Vitamin[4] sol 1 ml ; Micro[5] element 2 ml ; pH=6.0 with HCL)

از باكتري رشد يافته در محيط LGIP بر روي آن كشت داده شد. بدين‌ترتيب تعداد ٥ جدايه منسوب به *G. diazotrophicus* با استفاده از محيط‌هاي مذكور جداسازي شد و همچنين سه سويه وارداتي باكتري از مراكز تحقيقاتي كشورهاي مكزيك و آمريكا از اين گونه با مشخصات زير گونه‌اي PAL5(٥) ;PALst(٦) ;UAP-5560 (٧) جهت ادامة كار در نظر گرفته شد.

رسم منحني رشد و تغييرات **pH** و **OD**:

براي رسم منحني رشد باكتري از محيط كشت استاندارد مايع(LGIP+ عصاره مخمر $2gr.L^{-1}$) استفاده شد. ٥٠ml از اين محيط با يك لوپ ازكشت جوان باكتري رشد يافته بر روي پليت حاوي محيط GYC مايه زني و در درجه حرارت ٣٠°C بر روي شيكر انكوباتور رشد داده شد. بعد از ٢٤ ساعت به ml ١٠٠ از همين محيط به مقدار ٥ درصد حجم محيط كشت از سوسپانسيون باكتري رشد داه شده اضافه نموده و در همين شرايط رشد داده شد. در فواصل زماني ١٢ساعت از محيط كشت نمونه برداري شد و ضمن تهيه رقت هاي متوالي در سرم فيزيولوژيك (٠/٩% NaCl) به ميزان ٠/١ml از سه رقت نهائي بر روي محيط استاندارد جامد، در سه تكرار پخش گرديد و پس از ٤ روز تعداد كلني‌هاي ظاهر شده در سطح هر پليت (٣٠٠-٣٠ عدد) شمارش شد و متوسط آن در سه تكرار محاسبه گرديد. بطور هم زمان تغييرات pH وOD محيط رشد نيز اندازه‌گيري شد (شكل ١).



شكل ١- تغييرات جمعيت سويه‌هاي ٥ و ٨ *G. diazotrophicus* در طي دوره انكوباسيون

1.-Cycloheximide
2. 0.5g in 100ml 0.2N KOH
3.Glucose yeast extract carbonate calcium
4. Biotin 10 mg ; pridoxol-HCl 20mg ; H2O 100ml.
5. $CuSO_4$ $5H_2O$ 0.4g ; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.12g ; H_2BO_3 1.4g ; Na_2MoO_4. $2H_2O$ 1.0g ; $MnSO_4$. H_2O 1.5g ; H_2O 1000ml

آزمون اكسيداسيون اتانول

براي مقايسه تشابه اين باكتري با دو جنس *Gluconobacter* و *Acetobacter* از روش اكسيداسيون اتانول توسط *گار*(۱۹٦۸) استفاده گرديد. بدين منظور محيط كشت استاندارد جامد حاوي تركيبات (Bromocresol green (Yeast 0/002%;Agar 1.5%;pH =6.0 with Acetic acid extract 3.o%; تهيه و استريل گرديد. پس از سرد شدن(حدود ٤۵°C) به مقدار ۲% از حجم محيط، اتانول ۹٦% استريل اضافه شد و در زير لامينار در پليت پخش گرديد. پس از خنك شدن، از محيط كشت ۷۲ ساعت رشد يافته بر روي آن كشت شده كه پس از ۲٤ ساعت به علت اكسيداسيون الكل به اسيداستيك، خطوط كشت زرد رنگ شدند و اين رنگ بر روي محيط ثابت ماند.

تعيين توانايي تثبيت ازت مولكولي

براي اين منظور ابتدا جدايه‌هاي باكتري *G.diazotrophicus* در درون لوله هايي به حجم ۲۰ml كه داراي ml ۵ محيط كشت موربLGIP ، حاوي ۰/٦۵ گرم در ليتر عصاره مخمر بودند كشت نموده و به مدت ۵ روز در دماي ۳۰°C قرار داده شدند. پس از مسدود كردن لوله ها با در پوش لاستيكي، بوسيلة پمپ برقي كل هواي بالاي محيط تخليه شد و مخلوطي از گازهاي آرگون، اكسيژن و استيلن به ترتيب با نسبتهاي۷:۲:۱ به آن اضافه گرديد. بعد از دو ساعت مقدار ۵µl از هواي ظرف را توسط ميكرو سرنگ كشيده و به دستگاه گاز كروماتوگراف مدل شيماتزو با ستون ازنوع Propak, N با درجه حرارت‌هاي °C ۹۳= Oven و °C ۱۱۰= Detector و Injector تزريق و مقدار اتيلن موجود در محني اتيلن رسم شده توسط دستگاه به كمك منحني استاندارد اتيلن برحسب واحد µmol/ml.h محاسبه گرديد.. براي رسم منحني استاندارد مخلوط گازهاي آرگون، اكسيژن و اتيلن به ترتيب با نسبتهاي ۷:۲:۱ تهيه و حجم‌هاي مشخصي از آن را به دستگاه داده شد و منحني استاندارد اتيلن رسم گرديد. براي حذف ميزان خطا، مقدار اتيلن موجود در گاز استيلن مصرفي تعيين گرديد كه مقدار آن خيلي كم بود.

آزمون احياء نيترات

هدف تعيين توانايي اين باكتري در احياي نيترات به نيتريت مي‌باشد. محيط نيترات شامل: (Beef extract 3.0, Peptone (5.0 g.L^{-1}, KNO_3 1.0) ميباشد. مقدار۱۵ml از محيط فوق را در لوله آزمايش ريخته و باكتري را به آن تلقيح و در انكوباتور ۳۰°C قرار مي‌دهيم. پس از چند روز با اضافه كردن چند قطره از دو معرف(α-Naphthylamin (%0.5 و Sulfanilic acid (%0.8)و تغيير رنگ حاصله (قرمز رنگ) تشكيل نيتريت در محيط مشخص مي‌گردد.

آزمون اكسيداز

جهت تعيين وجود آنزيم اكسيداز در باكتري مورد آزمايش از معرف رنگي[1] TPD يك درصد استفاده شد. بعد از كشت باكتري بر روي محيط LGIP مقدار ۳-۲ قطره از معرف ، روي كلنيهاي رشد داده شده ريخته ميشود و تشكيل رنگ بنفش پس از ۱۰ تا ۱۵ ثانيه نتيجه آزمايش را مشخص مي‌نمايد.

آزمون كاتالاز

جهت تشخيص وجود آنزيم كاتالاز در اين باكتري از كلنيهاي رشد يافته آن بر روي محيط اختصاصي LGIP بر روي لام شيشه‌اي مي بريم وچند قطره آب اكسيژنه ۳% را بر روي آن مي‌چكانيم. تشكيل حباب‌هاي گاز اكسيژن نتيجه آزمايش را مشخص مي‌نمايد.

نتايج

جدايه هاي تهيه شده از بافت نيشكر در محيط GYC كلنيهاي قهوه‌اي همراه با رنگدانه قهوه‌اي محلول در آب تشكيل مي‌دهد كه اين مشخصه، گونه *A.diazotrophicus* را از ساير گونه‌هاي استوباكتر مجزا مي‌كند (۱۷,۱۱).

اين جدايه ها توانايي رشد در محيط قندي با گلوكز۳۰ % را دارا بودند و pH اين محيط را به حدود ۲/۲ كاهش دادند. درجدول ۱ تغييرات پ‌هاش در محيط گلوگز ۳۰% كه داراي پ‌هاش ۵/۵ است، مشاهده مي‌شود.

جدول۱- تغييرات pH درمحيط گلوكز ۳۰% و pH= ۵/۵ بعد از٤۸ساعت

شماره‌نمونه	۱	۲	۳	٤	۵	٦	۷	۸
PH	۲/۰	۲/۱	۲/۲	۲/۱	۲/۲	۲/۵	۲/۲	۲/۱

(۵,٦,۷)سويه هاي غير بومي ؛ (۱،۲،۳،٤،۸)جدايه هاي بومي

1. N, N, N, N, Tetramethyl- P-Phenylenediamine dihydrochlorille

باكتري‌ها در محيط كشت سيب‌زميني ابتدا كلنيهاي سفيد ايجاد نمودند كه پس ازده روز به رنگ قهوه‌اي سوخته در آمدند.

عدم تشكيل رنگ قرمز ارغواني با معرف رنگي TPD منفي بودن تست اكسيداز در تمامي جدايه‌ها و نمونه‌هاي وارداتي را نشان داد .

با تشكيل حباب‌هاي ضعيف گاز اكسيژن در آزمون كاتالاز، مثبت بودن آن، در تمامي جدايه‌ها و سويه هاي غير بومي مشخص گرديد .

در آزمون احياي نيترات عدم تشكيل رنگ قرمز در كشت تمامي جدايه‌ها و سويه هاي غير بومي پس از افزودن دو معرف، نشان از عدم احياي نيترات مي باشد كه با اضافه كردن پودر فلز روي به محيط و احياء نيترات به نيتريت و تشكيل رنگ قرمز تاييد گرديد .

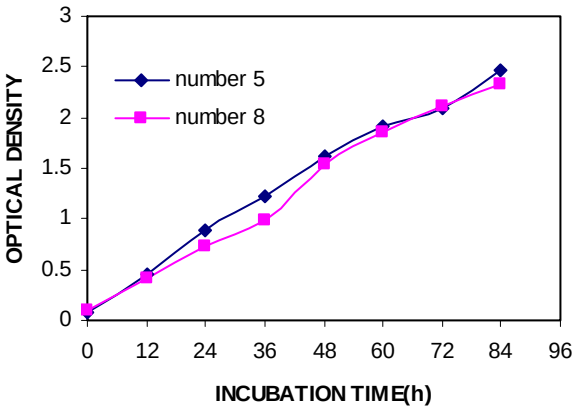
نتايج آزمون اكسيداسيون اتانول نشان داد كه باكتري مانند جنس گلوكونوباكتر توانايي اكسيداسيون اسيد استيك به CO_2 و H_2O را نداشته ولي چون از قند توليد اسيد مي‌نمايد، اسم تلفيقي دو جنس *Gluconacetobacter diazotrophicus* بر روي آن نهاده شده است(جدول ٢).

جدول ٢- آزمون هاي تشخيصي انجام شده بر روي جدايه هاي *G.diazotrophicus*

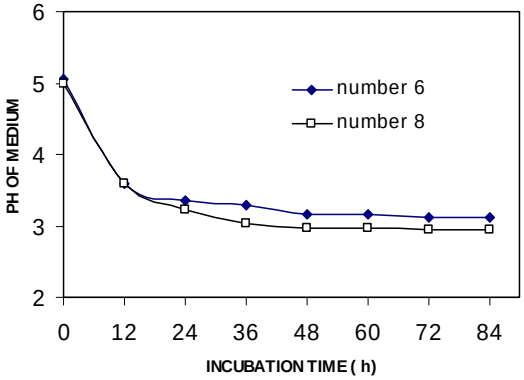
ويژگي‌هاي باكتري	جدايه‌هاي بومي	سويه‌هاي غيربومي
تحرك	+	+
واكنش گرم	-	-
رنگدانه قهوه‌اي محلول در آب بر روي محيط GYC	+	+
كلني به رنگ قهوه‌اي تيره بر روي محيط سيب‌زميني	+	+
رشد در محيط مايع ٣٠% گلوكز	+	+
تثبيت بيولوژيك ازت	+	+
احياي نيترات	-	-
آزمون اكسيداز	-	-
آزمون كاتالاز	+	+
مرحله دوم اكسيداسيون اتانول	-	-

منحني رشد باكتري نشان مي‌دهد كه فاز رشد لگاريتمي تاحدود ٧٢ ساعت ادامه داشته و با پايين آمدن pH بتدريج تعداد باكتريها درسوسپانسيون كاهش مي‌يابد (شكل ١).

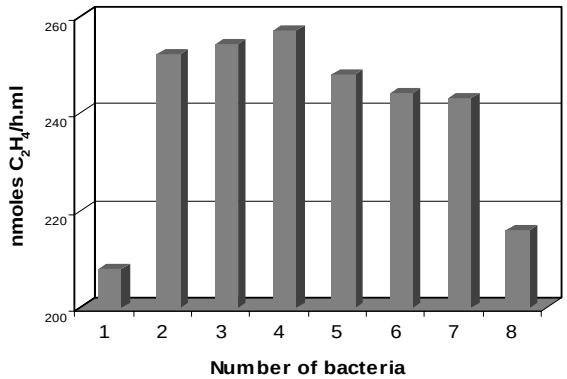
باكتريهاي جداسازي شده از بافت نيشكر تثبيت ازتي معادل و حتي بيشتر از سويه‌هاي وارداتي (٥، ٦، ٧) را دارا مي‌باشند كه در شكل ٤ نشان داده شده است.



شكل ٢- تغييرات كدورت در محيط كشت سويه‌هاي ٥ و ٨ *G. diazotrophicus* در طي دوره انكوباسيون



شكل ٣- تغييرات pH محيط كشت سويه‌هاي ٥ و ٨ *G. diazotrophicus* در طي دوره انكوباسيون



شكل ٤- ارزيابي فعاليت نيتروژناز در سويه‌هاي خارجي (٥، ٦، ٧) و جدايه‌هاي داخلي *G. diazotrophicus*

بحث

آزمايشات انجام شده بر روي جدايه‌ها و مقايسه آن با نمونه‌هاي وارداتي صحت مراحل جداسازي وتشخيص اين باكتري را نشان مي‌دهد. و با توجه به عدم امكان زنده ماندن باكتري در خاك و درون بافتي بودن آن ميتوان با مايه زني (تلقيح) ساقه‌هاي در حال كاشت ، جمعيت باكتري را در درون بافت گياه افزايش داد. اثر تلقيح دركشت سال دوم مشهودتر ميشود و تا چند سال ادامه مي‌يابد. افزايش نفوذپذيري و جمعيت باكتري‌هاي تثبيت كننده نيتروژن در داخل گياه نيشكر با تلقيح همزمان گياه با قارچ‌هاي VAM توسط پولا (۱۹۹۱) نشان داده شده است.

شمارش جمعيت و رسم منحني رشد، چگونگي رشد ،باكتري را در محيط كشت اختصاصي نشان ميدهد كه با كاهش pH در محيط ميزان جمعيت سيرنزولي پيدا كرده ولي ميزان كدورت همچنان افزايش مي‌يابد كه اين مربوط به آزاد شدن محتويات سيتوپلاسمي باكترهاي مرده مي‌باشد. با اندازه‌گيري OD، شمارش جمعيت در فاز لگاريتمي در هر زمان از رشد آسان مي‌گردد.

ميزان تثبيت ازت در باكتريهاي مورد مطالعه حدود ۲۰۷-۲۵۳ nmoles C_2H_4 $h^{-1}ml^{-1}$ بوده ، كمتر از ۵۰ داراي فعاليت كم بوده و قابل قبول نيست. نتايج بدست آمده با كارهاي *استفان و همكاران* (۱۹۹۱) و *دابرنير* (۱۹۸۸) مطابقت دارد. اندازه گيري ميزان تثبيت نيتروژن توسط *ريس* (۱۹۹٤) بر روي محيط نيمه جامد صورت گرفته و در زمان‌هاي مختلف همين نتايج را گرفته است. خارج كردن تمامي گاز بالاي محيط كشت و تزريق مخلوطي از سه گاز آرگون، اكسيژن، استيلن (۷:۲:۱) از احياي گاز نيتروژن موجود در هواي بالاي محيط كشت جلوگيري و احياء استيلن مشهودتر مي‌گردد. به گفته همين نويسنده استفاده از عصاره نيشكر در محيط كشت، ميزان تثبيت نيتروژن را افزايش مي‌دهد، انجام آزمايشهاي گلخانه‌اي و مزرعه‌اي به منظور بررسي تأثير تلقيح باكتري در افزايش رشد نيشكر ضرورت دارد.

منابع مورد استفاده

REFERENCES

۲. تهراني، م.م . ۱۳۷۷. نيترات از ديدگاه كشاورزي و محيط زيست. مجله زيتون ويژه نامه شماره ٦،. صفحات ۵۱-٤۸

۳. جبلي، ج.۱۳۷۸. تاثيرات زيست‌محيطي مواد شيميايي در توسعه پايدار منابع آب و خاك. فصلنامه شركت مهندسي مشاور مهاب قدس جلد هشتم صفحات ۲٦-۲۲.

٤. جعفرنژادي، ع و م ج. ملكوتي. روش مصرف بهينه كود براي افزايش عملكرد كمي و كيفي نيشكر. نشريه فني شماره ۵۲. وزارت كشاورزي – سازمان تحقيقات، آموزش و ترويج كشاورزي.

۵. غلامي، م. ۱۳۷۲. بررسي بيماران مبتلا به سرطان مري و معده در شهرستان ساري. نشريه شماره ۳. دانشگاه علوم پزشكي مازندران – ساري.

٦. منصور، غ.۱۳۸۱. توليد، مصرف و واردات شكر در جهان و مقايسه آن با ايران طي سالهاي ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۰ مجله شكرشكن – شماره ۲۷. صفحات ۳۳-۲۷

7. Alexander, A.G.1973. Sugarcane physiology. Elsevier Publ. Co. Amsterdam. 752p.
8. Azin,F., R.M.Raie & M.M.Mahmoudi.1998.Correlation between the levels of certain Carcinogenic and anticarcinogenic trace elements and esophageal cancer in northern Iran. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 39:179-184.
9. Baldani,J.I.2002.A brief story of nitrogen fixation in sugarcane-reasons for success in Brazil. *Funct. Plant Biolo* 22:417-423.
10. Baldani,J.I.,L.Caruso,V.L.D.Baldani,S.R.Goi,& J.Doberenier. 1997.Recent advances in BNF with non-legume plants .*Soil Biol. Biochem* 29(5/6):991-922

11. Balows,A.,H.G.Truper,M.Sworkin,W.Harder,& K.H.Schleifer.1991.The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. The Genera *Acetobacter and Gluconobacter,* Second Edition, Vol 3, Chapter 111.
12. Boddey,P.M.,S.U.V.Reis & J.Dobereiner. 1991. Biological nitrogen fixation associated with suger cane. *Plant and Soil* 137:111-117
13. Cavalcante,V.A. & J. Dobereiner. 1988. A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant and Soil* 108:23-31
14. Dobereiner. J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics and economic contributions. *Soils Biol. Biochem* 29(5/6):771-774
15. Dobereiner, J.1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs *plant and Soil* 110:207-212
16. Dobereiner, J. & A. P. Ruschel. 1958. Uma nova especie *Beijerinckia fluminensis Rerista de Biologia, Rio de Juniro*, p.261-279.
17. Fuentes-Ramirez,L.E., T. Jimenz-Salgado,I.R.Abarce-Ocampo & J.Caballero-Mellado. 1993. *Acetobacter diazotrophicus* an indole acetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* 154:145-150.
18. Holt, J.G.,N.R.Kriag, P.H.A.Senath, J.T.Staley,& S.T.Williams.1994.Bergeys, Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition.
19. Paula,M.A., V.M.Reis,& J.Dobereiner.1991.Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*).*Biology and Fertility of Soils* 11:111-115.
20. Reis V.M.,I.L. Olivers & J. Dobereiner.1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10:401-405
21. Stephan, M.P.,M.Oliveira, K.R.S.Teixeira,G.Martinex-Drets & J. Dobereiner.1991. Physiology and nitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus. FEMS Microbiology Letters* 77:67-72.
22. Yamada, Y., K.Hashimo,T.Ishikawa.1997. The phylogeny of acetic acid bacteria on the partial sequences of 16S ribosomol RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology and Biochemisty* 61: 1244-1251.