DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

بررسی فعالیت تثبیت نیتروژن، بیان ژن *nifH* و رشد در سیانوباکتری *Aliinostoc* sp.، تحت تاثیرمنابع نیتروژن، فسفر و پتاسیم

مریم نبی‌پور[۱]، محمد فارسی[۱*]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲] و امین میرشمسی کاخکی[۱]

[۱]ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

[۲] ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۱

چکیده

سیانوباکتری‌ها قدیمی‌ترین فتواتوتروف‌های اکسیژنی با توزیع اکولوژیکی گسترده بر روی زمین هستند. آنها با اثر بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک، موجب افزایش حاصلخیزی آن می‌شوند. بدلیل مضرات افزایش مصرف کودهای شیمیایی، جستجو برای منابع زیستی که حداقل قسمتی از نیاز محصول را فراهم کند، ضروری است. در این مطالعه با هدف افزایش کارایی کود زیستی سیانوباکتریایی، تاثیر عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم در قالب کودهای اوره، سوپرفسفات و کلرید پتاسیم، بر فعالیت تثبیت نیتروژن اندازه‌گیری شده بوسیله کروماتوگرافی گازی، بیان ژن *nifH* و رشد در سیانوباکتری *Aliinistoc* sp. بررسی شد. بطور کلی افزایش غلظت منابع نیتروژن و فسفر، رشد و فعالیت تثبیت نیتروژن را کاهش دادند. بیشترین اثر منبع نیتروژن بر میزان فعالیت نیتروژناری بود، بطوریکه در انتهای دوره آزمایشی در مقایسه با ابتدای آن (پیش از تیمار)، میزان فعالیت نیتروژنازی در حضور ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اوره، بترتیب ۵۰ و ۱۰۰ درصد کاهش یافت. فسفر اثر قابل‌توجهی بر رشد نمونه نشان داد و در بیشترین غلظت مورد استفاده از سوپرفسفات (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، کاهش رشد حدود ۸۰ درصدی مشاهده گردید. از طرف دیگر، پتاسیم بویژه در کمترین غلظت مورد استفاده (۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر)، موجب افزایش حدود ۲۰ درصدی رشد و افزایش دو برابری فعالیت نیتروژنازی شد. علاوه براین، ارزیابی بیان ژن *nifH* الگوی فعالیت نیتروژنازی را تایید نمود. در مجموع نتایج این مطالعه بیانگر لزوم توجه به مقدار عناصر مورد استفاده به همراه کود زیستی سیانوباکتریایی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیانوباکتری، کود زیستی، ژن *nifH*، تثبیت نیتروژن، Real-time RT-PCR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۸۸۰۵۷۷۷-۰۵۱، پست الکترونیکی: farsi@um.ac.ir

مقدمه

افزایش جمعیت جهانی به تقاضای بیشتر برای تولیدات کشاورزی منجر می‌شود. شیوه‌های سنتی مدیریت کشاورزی که در حال حاضر مورد استفاده می‌گیرند، بشدت به کاربرد کودها و سموم شیمیایی و شیوه‌هایی مانند خاکورزی شدید متکی هستند که منجر به بهره‌برداری بیش از حد از منابع طبیعی و همچنین آلودگی زیست-محیطی می‌شود. بنابراین برای اجتناب از گسترش این خسارات نیازمند اتخاذ شیوه‌هایی هستیم که نه تنها با محیط زیست سازگار باشند، بلکه مقرون بصرفه بوده و به ما در دستیابی به امنیت غذایی طولانی‌مدت کمک کنند. در جستجوی راه حل‌های پایدار و سازگار با محیط زیست برای بهبود بهره‌وری در کشاورزی، محققان توجه خود را به محصولات زیستی، بخصوص میکروارگانیسم‌ها متمرکز نموده‌اند (۱۱ و ۳۳).

سیانوباکتری‌ها که همچنین جلبک‌های سبز- آبی نامیده می‌شوند، قدیمی‌ترین فتواتوتروف‌های اکسیژنی بر روی

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

زمین هستند. این میکروارگانیسم‌ها توزیع اکولوژیکی گسترده‌ای داشته و در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها یافت می‌شوند. آنها همچنین منبع مهمی از ترکیبات فعال زیستی مانند ترکیبات فنلی، پلی‌ساکاریدها و مواد شبه‌هورمونی هستند که می‌تواند موجب حاصلخیزی خاک و تحریک رشد گیاهان شود (۱۱، ۱۶ و ۴۰). اثرات مفید تلقیح سیانوباکتریایی در تعدادی زیادی از محصولات مانند برنج، گندم، نخودفرنگی، جو، سویا، ارزن، جو دوسر، گوجه-فرنگی، تربچه، پنبه، نیشکر، ذرت، فلفل، کاهو و ... و همچنین در بهبود حاصلخیزی خاک در مطالعات مختلف گزارش شده است (۱، ۵ و ۱۵).

نیتروژن یک ماده مغذی ضروری برای رشد گیاهان است که با وجود فراوانی حضور آن در اتمسفر، گیاهان زراعی قادر به استفاده از آن در شکل عنصر نیتروژن نمی‌باشند و باید آن‌را از طریق خاک دریافت نمایند. با این حال، علاوه بر نامطلوب بودن استفاده از کودهای شیمیایی از نظر زیست‌محیطی، در مزارع برنج کارایی استفاده از کودهای شیمیایی حاوی نیتروژن بدلیل کاهش مقدار آن از طریق روندهایی مانند آبشویی آمونیوم که خود تابعی از عواملی همچون دما و pH است، بسیار پایین می‌باشد (۱۸ و ۲۲). بسیاری از گونه‌های سیانوباکتریایی توانایی تثبیت نیتروژن را دارند، فرآیندی که در آن نیتروژن اتمسفر را جذب و توسط آنزیم نیتروژناز به آمونیوم تبدیل می‌کنند. شناخته شده‌ترین آنزیم نیتروژناز، نیتروژناز مولیبدون است که توسط ژن‌های ساختاری *nifHDK* رمزگذاری می‌شود و از دو جزء پروتئینی دی‌نیتروژناز و دی‌نیتروژناز ردوکتاز تشکیل شده است. دی‌نیتروژناز یک ترامر با کوفاکتور مولیبدون–آهن (MoFe) است که زیرواحدهای آن توسط ژن‌های *nifD* و *nifK* کد می‌گردند. دی‌نیتروژناز با اتصال به دی‌نیتروژن اتمسفری، الکترون را به آن منتقل می‌کند. دی-نیتروژناز ردوکتاز نیز شامل یک کوفاکتور آهن و متشکل از دو زیرواحد یکسان است که بوسیله ژن *nifH* کد می‌شوند. این زیرواحد مسئول انتقال وابسته به ATP الکترون به ترامر دی‌نیتروژناز است. این جزء پروتئینی دارنده بیشترین توالی اسیدهای آمینه حفظ شده در بین پروتئین‌های نیتروژناز می‌باشد و بنابراین، هنگام جستجوی وجود نیتروژناز در ارگانیسم‌ها یا محیط‌های مختلف، ژن *nifH* مناسب‌ترین گزینه برای کاوش DNA خواهد بود (۴ و ۱۰).

حفظ باروری خاک با منابع تجدیدپذیر اصلی‌ترین نیاز کشاورزی پایدار بمنظور کاهش مصرف کودهای شیمیایی است (۲۶). در این راستا و در جهت استفاده از روش‌های سازگار با محیط زیست و با توجه به اهمیت جستجو برای یافتن منابع طبیعی بالقوه جهت استفاده بعنوان کود زیستی، آزمایشاتی در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان بر روی ۱۵ نمونه‌ی جداسازی شده از خاک‌های شالیزاری استان گلستان انجام شد. این نمونه‌ها ابتدا از نظر شاخص‌های ریخت‌شناختی بررسی و سپس بر اساس توالی ژن‌های 16s RrNA و *nifH* شناسایی شدند (۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۹). از میان آنها سیانوباکتری *Aliinistoc* sp. بر اساس آنالیزهای مرتبط با شاخص‌های موثر بر عملکرد برنج، بعنوان کود زیستی بالقوه برای استفاده در مزارع برنج برگزیده شد (داده های چاپ نشده). مطالعه پیش رو بر روی این نمونه منتخب بعنوان کود زیستی سیانوباکتریایی بالقوه صورت گرفت. با توجه به اهمیت و کاربرد سه عنصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم در کشاورزی، اطلاع از اثر این مواد بر روی رشد و متابولیسم سیانوباکتری‌ها، برای کاربردهای کشاورزی و دستیابی به بهترین عملکرد حایز اهمیت است. به همین دلیل، مطالعه حاضر با هدف افزایش کارایی کود زیستی سیانوباکتریایی و بررسی تاثیر این عناصر در قالب کودهای اوره، سوپرفسفات و کلرید پتاسیم، بر روی فعالیت تثبیت نیتروژن، بیان ژن *nifH* و رشد نمونه منتخب، انجام گرفت.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

مواد و روشها

شرایط رشد و تیمار: سیانوباکتری *Aliinostoc* sp.، بمنظور تشکیل هتروسیست‌ها و فعال شدن روند تثبیت نیتروژن در محیط مایع $BG11_0$ (فاقد ترکیبات نیتروژن)، در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس با دوره روشنایی- خاموشی ۸/۱۶ ساعت و جریان هوای ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه رشد یافت. سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد جمع‌آوری شدند و برای تلقیح به محیط‌های کشت جدید، مورد استفاده قرار گرفتند. کشت‌های جدید بعد از یک هفته تحت تیمار مقادیر مختلف نیتروژن، فسفر و پتاسیم، بترتیب در قالب کود اوره (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و کودهای سوپرفسفات و کلرید پتاسیم (هر کدام به مقدار ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. در این مطالعه از کودهای تجاری استفاده شد و مقادیر مورد استفاده بر اساس مطالعات مختلف و میزان مورد استفاده رایج این کودها در مزارع برنج انتخاب شدند (۳، ۲۶، ۲۸، ۲۹، ۳۱ و ۳۷). آزمایش در سه تکرار انجام پذیرفت و مقایسه فعالیت تثبیت نیتروژن، بیان ژن *nifH* و میزان رشد بین نمونه‌های تحت تیمار و شاهد (فاقد کود) در یک دوره ۶ روزه انجام گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت تثبیت نیتروژن: توان تثبیت نیتروژن مولکولی در ابتدا و انتهای دوره آزمایشی، با روش احیای استیلن (Acetylene reduction assay) (ARA) اندازه‌گیری شد. در این روش میزان گاز اتیلن تولید شده از احیای استیلن بعنوان شاخصی برای تعیین مقدار فعالیت آنزیم نیتروژنازی به کار می‌رود. ۱۵ میلی‌لیتر از کشت مایع سیانوباکتریایی در لوله‌های درپوش‌دار قرار داده شد، سپس ۱۰ درصد از هوای درون لوله با حجمی برابر از گاز استیلن جایگزین گشت، لوله‌ها در شرایط مشابه با شرایط کشت قرار گرفتند و پس از ۲ ساعت، ۰/۵ میلی‌لیتر از گاز داخل لوله به دستگاه کروماتوگرافی GOW-MAC series 816 تزریق شد. در پایان، بر اساس سطح زیر منحنی پیک‌های بدست آمده، غلظت اتیلن پدید آمده از احیای استیلن، براساس منحنی‌های استاندارد، بر حسب نانومول اتیلن بر میکروگرم کلروفیل در ساعت ($\mu g\ ch^{-1}\ h^{-1}$) برآورد گردید (۳۴).

استخراج RNA: برداشت سلول‌ها با سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه)، پیش از اعمال تیمار و همچنین در روزهای ۳ و ۶ انجام گرفت. برای استخراج RNA از کیت RNX-plus شرکت سیناژن استفاده شد. کیفیت RNAی استخراج شده، در ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی و غلظت نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر Shimatsu UV 1800 بررسی گشت. سپس نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I, RNase-free شرکت Thermo Scientific تیمار شد و بعنوان الگوی واکنش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. پس از یکسان‌سازی غلظت نمونه‌های RNA، cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Thermo Scientific به شماره کاتالوگ K1622 سنتز گشت. تمامی مراحل طبق دستورالعمل هر کیت انجام شد.

الگوی بیان ژن: واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR و با کیت سایبرگرین SYBR Green qPCR Master Mix شرکت Thermo Scientific طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۳ میکرو مولار از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱۰۰ نانوگرم cDNA الگو و آب عاری از نوکلئاز بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی-گراد و سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی-گراد و ۴۰ ثانیه در ۵۲ درجه سانتی‌گراد) بود. بمنظور استاندارد کردن داده‌ها، نمونه‌ها با ژن کنترل داخلی *rnpB* (Ribonuclease P RNA, subunit B) نرمال گردیدند (توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است). مقادیر بیان کمی ژن با مقایسه بین میزان بیان ژن در نمونه‌ها و

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

کنترل، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید (۲۰). ژن *nifH* بطور متعارف بعنوان نشانگر در روند تثبیت نیتروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد.

اندازه‌گیری غلظت کلروفیل: برای تعیین میزان رشد، از مقدار رنگدانه کلروفیلa بعنوان شاخص رشد استفاده شد. میزان کلرفیل نمونه مورد بررسی، پیش از اعمال تیمار و همچنین در روزهای ۲، ۴ و ۶ اندازه‌گیری شد. برای این کار، ابتدا عصاره سلولی با استفاده از متانول خالص، بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در دمای ۴ درجه سانتیگراد، استخراج و سپس محتوای کلروفیل آنها با استفاده از طیف‌سنجی در طول موج ۶۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۹).

جدول ۱- جفت آغازگرهای اختصاصی استفاده‌شده برای ژن‌های *nifH* و *rnpB*

ژن	توالی (′۳ →′۵)	اندازه قطعه تکثیرشده (bp)	منبع
nifH	F: CCT ACG ACG TAT TGG GTG AC R: TAA ACG TAC ACC ACC GGA GT	۱۷۰	Ermakova *et al*., 2013
rnpB	F: TAG GGA GAG AGT AGG CGT TG R: TTC TGT GGC ACT ATC CTC AC	۱۳۰	Pinto *et al*., 2012

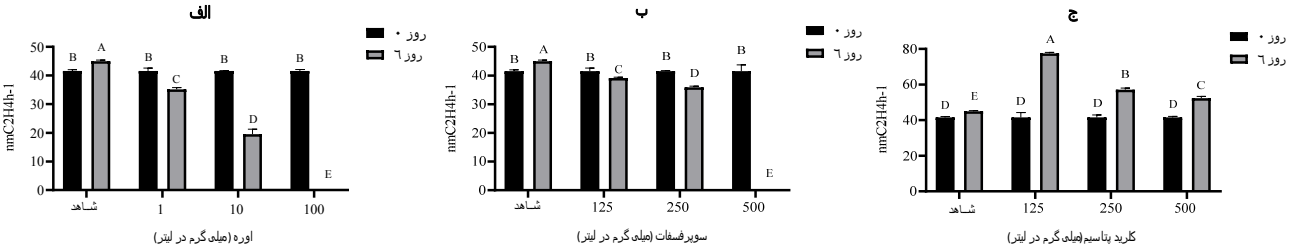
نتایج و بحث

در این مطالعه تاثیر مقادیر مختلف نیتروژن، فسفر و پتاسیم، بترتیب در قالب کودهای اوره، سوپرفسفات و کلرید پتاسیم که بطور متداول در مزارع برنج مورد استفاده قرار می‌گیرند، روی میزان فعالیت نیتروژنازی، بیان ژن *nifH* و رشد در سیانوباکتری *Aliinostoc* sp.، بعنوان کاندیدی برای استفاده بعنوان کود زیستی، در یک دوره رشدی شش روزه مورد بررسی قرار گرفت.

فعالیت تثبیت نیتروژن: نیتروژن آمونیومی موجود در اوره، کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز ایجاد نمود و مقایسه تولید گاز اتیلن حاصل از احیای استیلن بین ابتدا و انتهای دوره آزمایشی، نشان داد که غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اوره، بترتیب موجب کاهش ۱۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصدی در فعالیت نیتروژنازی نمونه مورد بررسی شدند (شکل ۱، الف). فسفر نیز باعث کاهش روند تثبیت نیتروژن نمونه شد و اختلاف قابل توجهی در تاثیر غلظت‌های مختلف آن وجود داشت. با وجود این‌که در غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سوپرفسفات، کاهش اندکی در میزان فعالیت نیتروژنازی رخ داد (بترتیب حدود ۶ و ۱۵ درصد)، در بالاترین غلظت مورد استفاده (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، میزان فعالیت نیتروژنازی بشدت کاهش یافت و فعالیتی که توسط کروماتوگرافی گازی قابل ردیابی باشد، مشاهده نشد (شکل ۱، ب). از طرف دیگر، پتاسیم با اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد، در هر سه غلظت مورد استفاده، موجب افزایش فرآیند تثبیت نیتروژن در سیانوباکتری مورد بررسی شد. البته با افزایش آن، از مقدار این روند افزایشی کاسته شد و در حالی که در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر کلرید پتاسیم مقدار گاز اتیلن تولید شده بیش از ۸۰ درصد افزایش یافت، افزایش حدود ۲۵ درصدی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۱، ج).

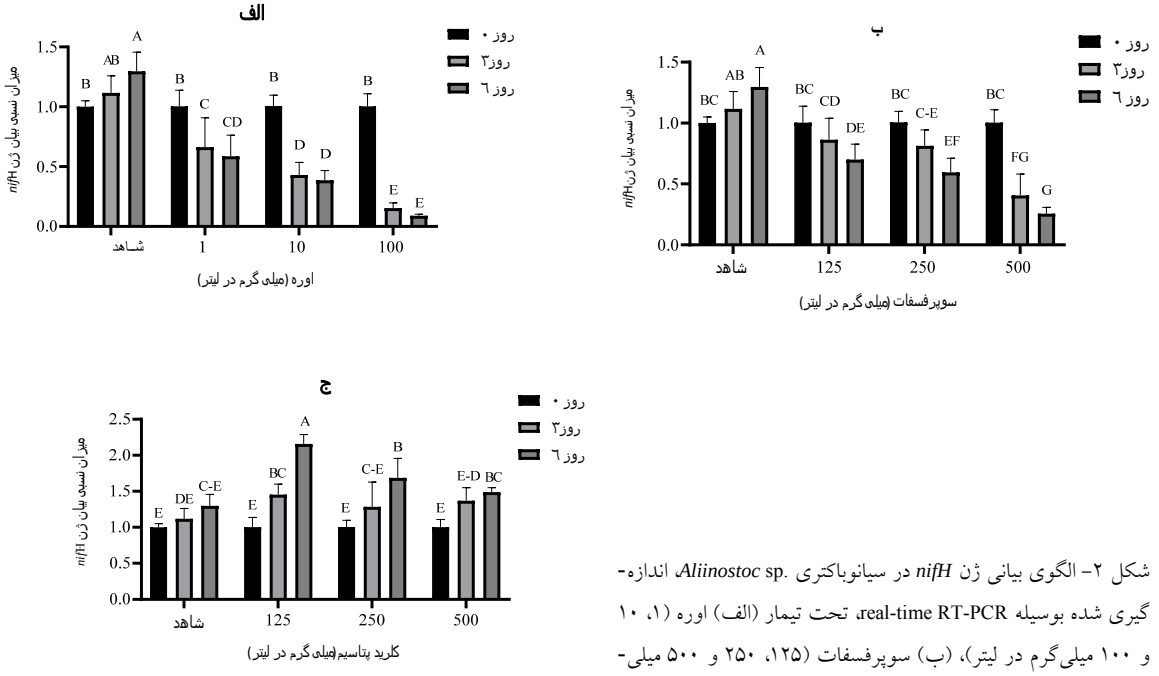
الگوی بیان ژن: در تمام تیمارهای مورد بررسی، نتایج Real-Time RT-PCR نشان داد که میزان نسبی بیان ژن *nifH* متناسب و تایید کننده الگوی فعالیت تثبیت نیتروژن آنها می‌باشد. یون آمونیوم موجب کاهش بیان ژن *nifH* شد و این کاهش شدید از روز سوم قابل مشاهده بود.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸



شکل ۱- فعالیت نیتروژنای سیانوباکتری *Aliinostoc* sp.، اندازه‌گیری شده با روش احیای استیلن، تحت تیمار (الف) اوره (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌درم در لیتر)، (ب) سوپرفسفات (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و (ج) کلرید پتاسیم (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر). مقادیر، میانگین سه تکرار می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار پنج درصد انجام شده است.

این نتیجه بیانگر تاثیر زود هنگام منبع ازت مورد استفاده بر روی روند تثبیت نیتروژن می‌باشد. با افزایش غلظت آن، روند کاهش بیان ژن شدت یافت و کاهش حدود ۴۰، ۶۰ و ۹۰ درصدی، بترتیب در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اوره مشاهده شد. در بیشترین مقدار مورد استفاده از این کود، با وجود اینکه فعالیت نیتروژنازی قابل ردیابی نبود، ژن *nifH* به مقدار کمی (حدود ۸ درصد) بیان شد (شکل ۲، الف). فسفر نیز موجب کاهش بیان ژن *nifH* شد. در مقادیر ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سوپرفسفات، کاهش بیان حدود ۳۰ و ۴۰ درصدی در طول دوره آزمایش اتفاق افتاد، اما بالاترین غلظت مورد استفاده از آن (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، با کاهش شدیدتر بیان ژن در روز سوم آزمایش همراه بود (حدود ۷۵ درصد) (شکل ۲، ب).

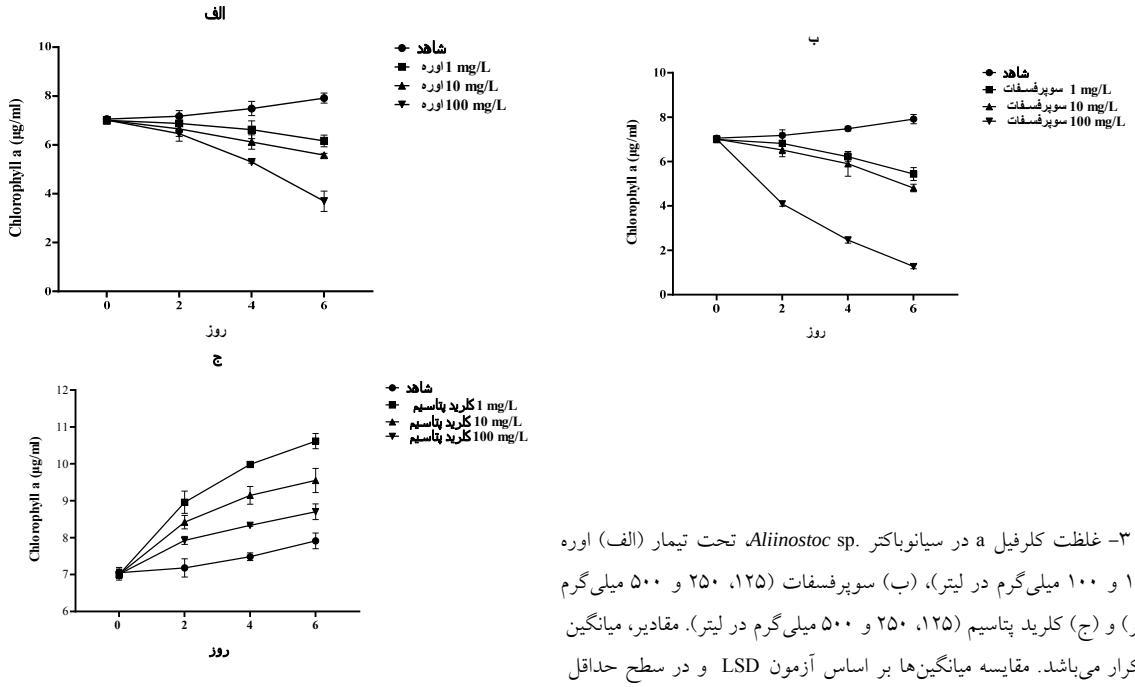


شکل ۲- الگوی بیانی ژن *nifH* در سیانوباکتری *Aliinostoc* sp.، اندازه‌گیری شده بوسیله real-time RT-PCR، تحت تیمار (الف) اوره (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، (ب) سوپرفسفات (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و (ج) کلرید پتاسیم (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر). مقادیر، میانگین سه تکرار می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار پنج درصد انجام شده است.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

در تیمار پتاسیم، همانند شاهد، بیان ژن *nifH* افزایش یافت. افزایش غلظت مورد استفاده از آن موجب کاهش این اثر فزاینده شد، بطوریکه در حضور ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر کلرید پتاسیم، بیان ژن *nif*H بیش از دو برابر افزایش یافت ولی این مقدار در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، به افزایش حدود ۵۰ درصدی کاهش پیدا کرد (شکل ۲، ج).

الگوی رشد: در حالی‌که نمونه شاهد از رشد تدریجی حدود ۱۰ درصدی در طول دوره آزمایشی برخوردار بود، نیتروژن آمونیومی در هر سه غلظت مورد استفاده، رشد نمونه مورد نظر را کاهش داد. این کاهش بطور یکنواخت در طول دوره آزمایشی اتفاق افتاد. برای نمونه، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اوره نسبت به زمان پیش از اعمال تیمار، کاهش رشد حدود ۵، ۱۳ و ۲۱ درصدی، بترتیب در روزهای ۲، ۴ و ۶ مشاهده شد. با افزایش غلظت نیتروژن، کاهش رشد شدیدتری اتفاق افتاد و در حالی‌که در روز ۶، در مقایسه با روز نخست، در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر اوره کاهش رشد حدود ۱۰ درصدی مشاهده شد، رشد در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اوره تقریباً به نصف کاهش یافت (شکل ۳، الف). فسفر در بالاترین غلظت مورد استفاده، کاهش شدیدی در رشد نمونه مورد نظر ایجاد نمود و در حالی‌که اختلاف رشد ابتدا و انتهای دوره آزمایشی در تیمارهای ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سوپرفسفات، بترتیب حدود ۲۰ و ۳۰ درصد بود، در حضور ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از این کود، کاهش رشد حدود ۸۰ درصدی مشاهده شد (شکل ۳، ب). برخلاف نیتروژن و فسفر، پتاسیم اثر افزایشی بر روی رشد سیانوباکتری مورد مطالعه داشت. کمترین غلظت آن، موجب بیشترین رشد در نمونه مورد نظر شد و با افزایش غلظت، افزایش رشد کمتری اتفاق افتاد (افزایش رشد حدود ۵۰ درصدی در حضور ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر، در مقایسه با افزایش حدود ۲۰ درصدی در حضور ۵۰۰ میلی-گرم در لیتر کلرید پتاسیم) (شکل ۳، ج).



شکل ۳- غلظت کلرفیل a در سیانوباکتر *Aliinostoc* sp.، تحت تیمار (الف) اوره (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، (ب) سوپرفسفات (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و (ج) کلرید پتاسیم (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر). مقادیر، میانگین سه تکرار می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار پنج درصد انجام شده است.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

سیانوباکتری‌ها می‌توانند منابع مختلف نیتروژن مانند نیترات، آمونیوم، اوره و دی‌نیتروژن اتمسفری را مورد استفاده قرار دهند. سیانوباکتری‌ها نیتروژن اتمسفری را تنها در شرایط کمبود نیتروژن تثبیت می‌کنند و در حضور منابع خارجی نیتروژن، آنزیم نیتروژناز مهار خواهد شد (۱۸ و ۳۶). در این مطالعه، در مجموع فعالیت تثبیت نیتروژن و رشد سیانوباکتری *Aliinostoc* sp. درحضور منبع نیتروژن کاهش یافت. کاهش تدریجی رشد از ابتدای دوره آزمایشی آغاز شد و با افزایش غلظت نیتروژن، کاهش رشد بیشتری اتفاق افتاد. کاهش رشد سیانوباکتری‌ها در حضور منابع خارجی نیتروژن در مطالعات مختلف گزارش شده است، برای نمونه کبیر و الشهاوی (۲۰۱۲) که اثر آمونیوم و نیترات را روی رشد و تثبیت نیتروژن سویه‌های مختلف *Nodularia spumigena* بررسی کردند، کاهش رشد برخی از سویه‌های مورد آزمایش را از روز سوم مشاهده نمودند. همچنین در مطالعه‌ی دیگری روی نمونه‌ی مشابه، کاهش رشد در حضور آمونیوم، از روز ششم گزارش شد (۳۶).

فعالیت تثبیت نیتروژن نیز بشدت تحت تاثیر نیتروژن قرار گرفت. با افزایش مقدار آن کاهش شدیدی در روند تثبیت نیتروژن مشاهده شد، بطوریکه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کود اوره، فعالیت نیتروژنازی قابل مشاهده نبود. متناسب با این نتیجه، بیان ژن *nifH* نیز در حضور نیتروژن، از روز سوم آزمایش بشدت کاهش یافت. مطالعات مختلفی با این نتایج مطابقت دارد. کبیر و الشهاوی (۲۰۱۲) و وینتیال و الشهاوی (۲۰۰۷)، کاهش شدید فعالیت نیتروژنازی و بیان ژن *nifH* سیانوباکتری *Nodularia spumigena* را در حضور مقادیر مختلف آمونیوم مشاهده نمودند. همچنین تاثیر منفی آمونیوم بر روی بیان ژن *nifH* و فعالیت تثبیت نیتروژن در سیانوباکتری *Trichodesmium erythraeum* نیز گزارش شده است (۷). مهار فعالیت تثبیت نیتروژن در حضور منابع خارجی نیتروژن در جنس‌های *Anabaena* و *Nostoc* نیز در مطالعات گوناگون مشاهده شده است (۶، ۱۶ و ۲۳).

فسفر، عنصر مورد نیاز برای رشد نرمال سیانوباکتری‌ها و دارای نقشی مهم در بسیاری از مراحل سنتز سلولی و انتقال انرژی آنها می‌باشد (۲). همچنین فسفر برای تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در سیانوباکتری‌ها ضروری است و محدودیت آن موجب کاهش شدید فتوسنتز اکسیژنی، کاهش فعالیت نیتروژناز و سایر آنزیم‌های فعال مرتبط با متابولیسم نیتروژن می‌شود (۳۸). نتایج گوناگونی در مورد اثر فسفر بر روی رشد سیانوباکتری‌ها، با توجه به مقدار فسفر و نمونه‌ی مورد مطالعه، گزارش شده است. مصرف مقادیر کم فسفر می‌تواند افزایش رشد سیانوباکتری‌ها را به دنبال داشته باشد، برای نمونه افزودن ۳ میلی‌گرم برلیتر فسفر موجب رشد جنس‌های *Anabaena* و *Oscillatoria* شد (۳۱). در سیانوباکترهای *Anabaena variabilis* و *Westiellopsis prolifica* نیز افزایش رشد در حضور ۳۰ میلی‌گرم فسفر صورت پذیرفت (۳۸). همچنین در مطالعه‌ای که بمنظور بررسی اثر فسفر (۰/۲ میلی‌مول)، آهن (۲ نانومول) و نیتروژن (۱ میلی‌مول) بر روی سیانوباکترهای تک‌سلولی و رشته‌ای تثبیت کننده نیتروژن در اقیانوس اطلس شمالی صورت گرفت، بیشترین مقدار رشد زمانی اتفاق افتاد که فسفر و نیتروژن بطور همزمان به محیط اضافه شدند. علاوه بر این افزودن فسفر به تنهایی، بر روی نرخ تثبیت نیتروژن بی‌اثر بود و افزایش فعالیت تثبیت نیتروژن و بیان ژن *nifH* تنها زمانی اتفاق افتاد که فسفر به همراه آهن مورد استفاده قرار گرفت (۲۴).

از طرف دیگر حضور غلظت‌های بالای فسفر می‌تواند موجب کاهش رشد سیانوباکتری‌ها شود. در این راستا مطالعه‌ی بررسی غلظت‌های مختلف فسفات و نیترات بر روی دو سویه از سیانوباکتری *Synechococcus* sp. قابل ذکر است که غلظت پایین فسفات (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) تاثیری بر روی رشد نداشت و غلظت بالای آن (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) موجب تأخیر و کاهش رشد در هر دو سویه مورد مطالعه شد (۹). در مطالعه‌ی حاضر نیز فسفر اثر منفی بر روی رشد و فعالیت تثبیت نیتروژن نمونه‌ی

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

مورد بررسی داشت، بطوری‌که در حضور ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سوپرفسفات، کاهش رشد از ابتدای دوره آزمایش کاملاً مشهود بود، اما در حضور مقادیر کمتر فسفر، کاهش رشد به مقدار کمتر و بصورت تدریجی اتفاق افتاد. فسفر روند تثبیت نیتروژن و بیان ژن *nifH* را نیز در سیانوباکتری *Aliinostoc* sp. کاهش داد. در حالی‌که در غلظت‌های کمتر سوپرفسفات (۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) فرآیند تثبیت نیتروژن و بیان ژن *nifH* متناسب با آن، روند کاهشی اندک و تدریجی داشت، در غلظت بالای آن (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) مهار کامل فعالیت نیتروژنازی صورت پذیرفت.

پتاسیم دارای نقش‌های حیاتی در رشد و متابولیسم سیانوباکتری‌هاست. علاوه بر نقش آن بر pH درون سلولی و آماس سلولی، پتاسیم بر روی روند فتوسنتز و تثبیت نیتروژن سیانوباکتری‌ها نیز موثر است. پاسخ سیانوباکتری‌ها به حضور مقادیر مختلف پتاسیم متفاوت است. در مطالعه‌ای بر روی سیانوباکتری *Anabaena torulosa*، حذف پتاسیم از محیط کشت موجب اختلالات متابولیکی متعدد شد، بطوریکه کاهش رشد، کم شدن محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و مهار فعالیت نیتروژنازی از پیامدهای فقدان پتاسیم در این سیانوباکتری هتروسیست‌دار بود. حال آنکه، تیمار این نمونه با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پتاسیم (بصورت کلرید پتاسیم) در محیط BG11 موجب افزایش رشد آن شد (۳ و ۳۰). از طرف دیگر افزودن پتاسیم به محیط *Microcystis* sp. موجب کاهش رشد آن گشت، اما میزان تحمل سویه‌های مختلف آن به مقدار پتاسیم بسیار متفاوت بود. در حالی‌که در مطالعه‌ای افزودن حدود ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پتاسیم موجب کاهش شدید رشد این سیانوباکتری شد (۳۲)، در مطالعه‌ی دیگر افزایش پتاسیم تا ۵۰۰ میلی-گرم در لیتر تاثیری بر روی برخی از سویه‌ها نداشت (۳۰). حتی سویه‌هایی از این جنس گزارش شده‌اند که می‌توانند رشد زیادی در غلظت نمکی ۱۰ گرم در لیتر داشته باشند (۳۵). در مطالعه‌ی حاضر پتاسیم موجب افزایش رشد و فعالیت تثبیت نیتروژن در نمونه مورد بررسی شد. البته این روند حالت کاهشی داشت و با افزایش مقدار پتاسیم، از میزان اثر افزایشی آن کاسته شد. بیشترین افزایش در رشد، در کمترین مقدار مورد استفاده (۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر کلرید پتاسیم) اتفاق افتاد که مقدار کلروفیل آن در انتهای دوره آزمایشی در مقایسه با ابتدای دوره، تقریباً ۵۰ درصد افزایش یافته بود. این افزایش در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید پتاسیم، حدود ۲۰ درصد بود. بیشترین مقدار گاز اتیلن تولید شده ناشی از فعالیت نیتروژناز ردوکتاز نیز در کمترین مقدار پتاسیم مورد استفاده بدست آمد، بیش از ۸۰ درصد افزایش در مقایسه با حدود ۲۵ درصد افزایش در حضور ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید پتاسیم. در همین راستا بیان ژن *nifH* نیز افزایش قابل ملاحظه‌ای در حضور ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر کلرید پتاسیم نشان داد و مقدار آن در روز ۶ تقریباً دو برابر شد.

نتایج کلی این مطالعه نشان دهنده تاثیر قابل ملاحضه عناصر مختلف بر رشد و روند تثبیت نیتروژن سیانوباکتری‌هاست. بطوریکه منبع ازته اوره، حتی در مقادیر کم، توانست موجب کاهش شدید روند تثبیت نیتروژن گردد (کاهش ۵۰ درصدی و توقف فعالیت نیتروژنازی بترتیب در ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اوره در این مطالعه). در مصرف منابع حاوی فسفر و پتاسیم هم باید توجه لازم صورت گیرد، چراکه سوپرفسفات، متناسب با غلظت مورد استفاده، می‌تواند موجب اثر بازدارندگی محدود و یا گسترده بر رشد و روند تثبیت نیتروژن سیانوباکتری‌ها شود (مشاهده ۲۰ تا ۸۰ درصد کاهش رشد در حضور مقادیر ۱۲۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سوپرفسفات در این مطالعه). علاوه بر این، با وجود اینکه استفاده از کلرید پتاسیم تا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار رشد و روند تثبیت نیتروژن در مطالعه حاضر شد، بدلیل روند کاهشی این اثر مهیج با افزایش مقدار این منبع پتاسه، استفاده از غلظت‌های بیشتر مطلوب نخواهد بود. هر چند، انجام مطالعات بیشتر جهت بررسی اثرات متقابل احتمالی استفاده همزمان چندین کود مختلف

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

بر روی سیانوباکتری‌ها و همچنین مطالعه اثر آنها بر سایر مسیرهای مهم متابولیسمی، بمنظور دستیابی به مقادیر کودی مناسبی که بتواند با کمترین تأثیر نامطلوب بر کود سیانوباکتریایی و محیط، موجب دستیابی به بهترین عملکرد ممکن شود، ضروری بنظر می‌رسد.

منابع

۱- سعادت نیا، ه. ریاحی، ح. فخاری، ج. ۱۳۸۹. استفاده از جلبک‌های سبز-آبی جداشده از یک شالیزار در استان گیلان بعنوان کود زیستی در گیاه برنج (*oryza sativa*). مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۳(۶): ۸۱۶-۸۲۴.

۲- نوروزی، ب. احمدی‌مقدم، ع. ۱۳۸۶. گزارش جدیدی از روابط بین ماکروالمانهای خاک و پراکنش سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار در شالیزار، گندم زار و جنگل استان گلستان. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۰(۱): ۸۹-۹۸.

3-Alahari, A. and Apte, S.K. 1998. Pleiotropic effects of potassium deficiency in a heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena torulosa*, Microbiology. 144: 1557-1563.

4-Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M.G. and Newton, W.E. 2010. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. Microbiology and molecular biology reviews, 74(4): 529-551.

5-Chittora, D., Meena, M., Barupal, T., Swapnil, P. and Sharma, K. 2020. Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. Biochemistry and biophysics reports, 22: 100737.

6-Dittmann, E., Wiegand, C. 2006. Cyanobacterial toxins–occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. Molecular Nutrition & Food Research, 50: 7–17.

7-El-Shehawy, R., Lugomela, C., Ernst, A. and Bergman, B. 2003. Diurnal expression of *hetR* and diazocyte development in the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*. Microbiology, 149: 1139-1146.

8-Ermakova, M., Battchikova, N., Allahverdiyeva, Y. and Aro, E.M. 2013. Novel heterocyst□specific flavodiiron proteins in *Anabaena* sp. PCC 7120. FEBS letters, 587: 82-87.

9-Ernst, A., Deicher, M., Herman, P.M. and Wollenzien, U.I. 2005. Nitrate and phosphate affect cultivability of cyanobacteria from environments with low nutrient levels. Applied and Environmental Microbiology, 71: 3379-3383.

10-Flores, E. and Herrero, A. 2005. Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. Biochemical Society Transactions, 33: 164-167

11-Gonçalves, A.L. 2021. The use of microalgae and cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: a review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. Applied Sciences. 11(2): 871.

12-Green, S.J., Blackford, C., Bucki, P., Jahnke, L.L. and Prufert-Bebout, L. 2008. A salinity and sulfate manipulation of hypersaline microbial mats reveals stasis in the cyanobacterial community structure. The International Society for Microbial Ecology journal, 2(5): 457-470.

13-Gugger, M., Lyra, C., Henriksen, P., Coute, A., Humbert, J.F. and Sivonen, K. 2002. Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(5): 1867-1880.

14-Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C. and Humbert, J.F. 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. Applied and Environmental Microbiology, 71(2): 1097-1100.

15-Hashtroudi, M.S., Ghassempour, A., Riahi, H., Shariatmadari, Z. and Khanjir, M. 2013. Endogenous auxins in plant growth-promoting Cyanobacteria—*Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola*. Journal of applied phycology, 25: 379-386.

16-Herrero A., Muro-Pastor A., Flores E. 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. Journal of Bacteriology, 183: 411–425.

17-Kabir, A.H. and El-Shehawy, R. 2012. Expression of *nifH*, *hetR*, and *ndaF* genes in *Nodularia spumigena* under nitrogen sources. Plant Biosystems, 146: 992-1000.

18-Kaushik, B.D., 2014. Developments in cyanobacterial biofertilizer. Proceedings of the

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6 مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

Indian National Science Academy, 80: 379-388.

19-Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, J.R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. Preslia, 86(4): 295-335.

20-Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods, 25(4): 402-408.

21-Nübel, U., Garcia-Pichel, F. and Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Applied and environmental microbiology, 63(8): 3327-3332.

22-Mandal, B., Vlek, P.L.G. and Mandal, L.N. 1999. Beneficial effects of blue-green algae and Azolla, excluding supplying nitrogen, on wetland rice fields: a review. Biology and Fertility of Soils, 28: 329-342.

23-Meeks, JC., Elhai J. 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66: 94–121.

24-Mills, M.M., Ridame, C., Davey, M., La Roche, J. and Geider, R.J. 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. Nature, 429: 292-296.

25-Mulligan, M.E. and Haselkorn, R., 1989. Nitrogen fixation (nif) genes of the cyanobacterium *Anabaena* species strain PCC 7120. The nifB-fdxN-nifS-nifU operon. Journal of Biological Chemistry, 264: 19200-19207.

26-Pathak, J., Maurya, P.K., Singh, S.P., Häder, D.P. and Sinha, R.P. 2018. Cyanobacterial farming for environment friendly sustainable agriculture practices: innovations and perspectives. Frontiers in Environmental Science, 6 (7).

27-Pimentel, J.S. and Giani, A. 2014. Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic *Microcystis* strains. Applied and environmental microbiology, 80(18): 5836-5843.

28-Pinto, F., Pacheco, C.C., Ferreira, D., Moradas-Ferreira, P. and Tamagnini, P. 2012. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria. PloS one, 7(4): e34983.

29-Repka, S., Koivula, M., Harjunpä, V., Rouhiainen, L. and Sivonen, K. 2004. Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium *Anabaena* strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. Applied and environmental microbiology, 70(8): 4551-4560.

30-Sandrini, G., Huisman, J. and Matthijs, H.C. 2015. Potassium sensitivity differs among strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis* and correlates with the presence of salt tolerance genes. FEMS microbiology letters, 362: 121-128.

31-Seale, D.B., Boraas, M.E. and Warren, G.J. 1987. Effects of sodium and phosphate on growth of cyanobacteria. Water research, 21: 625-631.

32-Shukla, B., and Rai, L.C. 2007. Potassium-induced inhibition of nitrogen and phosphorus metabolism as a strategy of controlling *Microcystis* blooms. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23: 317-322.

33-Singh, J.S., Kumar, A., Rai, A.N. and Singh, D.P. 2016. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. Frontiers in microbiology, 7: 529.

34-Soltani, N., Khavari-Nejad, R.A., Yazdi, M.T., Shokravi, S. and Fernández-Valiente, E. 2006. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH values. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22: 571-576.

35-Tonk, L., Bosch, K., Visser, P.M. and Huisman, J. 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Aquatic Microbial Ecology, 46: 117-123.

36-Vintila, S. and El-Shehawy, R. 2007. Ammonium ions inhibit nitrogen fixation but do not affect heterocyst frequency in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* strain AV1. Microbiology, 153: 3704-3712.

37-Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In Handbook of Microalgal Mass Culture, ed. Richmond A. (pp. 117–147). Florida: CRC Press.

38-Yandigeri, M.S., Yadav, A.K., Meena, K.K. and Pabbi, S. 2010. Effect of mineral phosphates on growth and nitrogen fixation of diazotrophic cyanobacteria *Anabaena variabilis* and

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.5.6 مقاله پژوهشی، صفحات: ۹۷-۷۸

Westiellopsis prolifica. Antonie van Leeuwenhoek, 97: 297-306.

39-Zavřel, T., Sinetova, M.A. and Červený, J. 2015. Measurement of chlorophyll a and carotenoids concentration in cyanobacteria. Journal of Biotechnology, 5: 9.

40-Zutshi, S. and Fatma, T. 2015. Cyanobacteria. In The Algae World (pp. 57-89). Springer, Dordrecht.

Evaluation of nitrogen fixation activity, *nifH* gene expression and growth in cyanobacteria *Aliinostoc* sp., Affected by nitrogen, phosphorus and potassium sources

Nabipour M.[1], Farsi M.[1*], Nematzadeh Gh.A.[2] and Mirshamsi Kakhki A.[1]

[1] Dept. of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

[2] Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. of Iran

Abstract

Cyanobacteria are the oldest oxygenic photoautotrophs on earth with a wide ecological distribution. They increase soil productivity by affecting its physicochemical properties. Increasing the application of chemical fertilizers is harmful. Therefore, it has become necessary to look for alternative renewable resources to meet at least a part of the demand for crops. In this study, aimed at increasing the efficiency of cyanobacterial biofertilizer, the effects of nitrogen, phosphorus and potassium elements in the form of urea, superphosphate and potassium chloride fertilizers were evaluated on nitrogen fixation activity measured by gas chromatography, *nifH* gene expression and the growth of cyanobacterium *Aliinistoc* sp. In general, the growth and nitrogen fixation activity of the sample decreased as the concentration of nitrogen and phosphorus sources increased. The most effect of nitrogen source was on nitrogenase activity, and at the end of the experimental period compared to the beginning (before treatment), the amount of nitrogenase activity decreased 50 and 100% in the presence of 10 and 100 mg/L urea, respectively. Phosphorus had a significant effect on the growth of the sample, and at the highest concentration of superphosphate (500 mg/L), growth declined about 80%. On the other hand, potassium especially at the lowest concentration (125 mg/L), significantly increased growth by about 20% and doubled nitrogenase activity. In addition, the evaluation of *nifH* gene expression confirmed the pattern of nitrogenase activity. In general, the results of this study indicate that the dosage of elements used in combination with cyanobacterial biofertilizers should be considered.

Keywords: biofertilizer, cyanobacteria, *nifH* gene, nitrogen fixation, Real-time RT-PCR