

Screening of Nitrogen-Fixing Bacteria Based on a Novel Colorimetric Method

Maryam Layegh Haghighi¹, Ali Mohammadi^{2*}, Maryam Mousivand^{3*}, Elmira Tizjang⁴

(Received: December, 2024

Accepted: May, 2025)

Abstract

Sustainable agricultural development has reduced nitrogen fertilizer consumption and resulted in nitrogen biofertilizers accounting for 70% of the global microbial market. The complexity and high cost of conventional methodologies remain major challenges for screening diazotrophic bacteria; therefore, simple, precise, and low-cost techniques should be introduced. In this research, a novel colorimetric method was developed by converting spectrophotometric data into RGB and HSV values using the smartphone Color Grab application to estimate biological nitrogen fixation. Twelve *Bacillus subtilis* isolates and *Azotobacter chroococcum* were screened for nitrogen fixation based on the color change of NFB medium containing bromothymolblue. Nitrogen concentration was quantified using a standard curve obtained from spectrophotometric data. Converting spectroscopic data into smartphone colorimetry values enables fast, accurate, and low-cost monitoring of nitrogen-fixing strains. According to the colorimetric results, the S index ($R^2 \leq 0.97$) in both open and closed systems was successfully used for standard curve drawing in the range of 0 to 18 $\mu\text{g ml}^{-1}$ to estimate different nitrogen concentrations. Based on the NFB medium color shift, all bacterial isolates except A15d and g33b strains were able to produce ammonia. The nitrogen fixation capacity of the bacterial isolates ranged from 1.65 $\mu\text{g ml}^{-1}$ to 13.32 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Strains g19l and W exhibited the highest nitrogen concentrations, estimated at 13.32 and 12.49 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The high concordance between the spectroscopic and colorimetric data substantiated the efficacy of the employed method for precise and streamlined screening of diazotrophic bacterial strains.

Keywords: Bio-fertilizers, Colorimetric methods, Nitrogen fixing bacteria, Smartphone

Layegh Haghighi M., Mohammadi A., Mousivand M. and Tizjang E. 2025. Screening of nitrogen-fixing bacteria based on a novel colorimetric method. *Applied Soil Research*, 13(3): 79-93.

1- Former MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran (Co-Corresponding Author)

3-Assistant Professor, Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran (Corresponding Author)

4-Department Specialist, Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

* Corresponding Author Email: m.mousivand@abrii.ac.ir, a.mohammadi@alzahra.ac.ir

غربال‌گری باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مبتنی بر روش رنگ‌سنجی نوین

مریم لایق حقیقی^۱، علی محمدی^{۲*}، مریم موسیوند^۳، المیرا تیزجنگ^۴

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۲)

چکیده

تلاش برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار با هدف توسعه کشاورزی پایدار منجر به اختصاص سهم ۷۰ درصدی کودهای زیستی تثبیت‌کننده نیتروژن اتمسفری در بازار جهانی کودهای میکروبی شده است. پیچیدگی و هزینه بالای روش‌های مرسوم اندازه‌گیری میزان تثبیت زیستی نیتروژن یکی از چالش‌های مهم در غربال‌گری سویه‌های باکتریایی دیازوتروف است که ضرورت معرفی روش‌های ساده، دقیق و ارزان‌قیمت را محرز می‌سازد. هدف پژوهش حاضر توسعه روش جدید رنگ‌سنجی مبتنی بر نرم‌افزار رایگان Color grab و گوشی هوشمند همراه بود. این روش تبدیل داده‌های حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری به شاخص‌های RGB و HSV و نیز اندازه‌گیری کمی نیتروژن را با هزینه‌ی کم و سهولت بالا امکان‌پذیر می‌سازد. غربال‌گری کیفی ۱۲ جدایه باکتریایی *Bacillus subtilis* و سویه استاندارد *Azotobacter chroococcum* در محیط کشت عاری از نیتروژن (NFB) و حاوی برموتیمول بلو با تغییر رنگ محیط انجام شد. اندازه‌گیری کمی میزان تثبیت زیستی نیتروژن به کمک منحنی استاندارد ترسیم‌شده با روش اسپکتروفتومتری صورت گرفت. با تبدیل داده‌های حاصل از طیف‌سنجی به شاخص رنگ‌سنجی در گوشی هوشمند همراه، امکان غربال سریع، دقیق و کم‌هزینه سویه‌های تثبیت‌کننده نیتروژن فراهم گردید. بر اساس نتایج حاصل از روش رنگ‌سنجی، شاخص $S (R^2 \leq 0.97)$ در هر دو فضای باز و بسته با موفقیت مبنای ترسیم منحنی استاندارد مبتنی بر غلظت‌های مختلف نیتروژن در محدوده صفر تا $18 \mu\text{g ml}^{-1}$ قرار گرفتند. بر اساس تغییر رنگ محیط کشت NFB، تمام جدایه‌ها به‌جز جدایه‌های A15d و g33b قادر به تولید یون آمونیوم بودند. میزان کمی غلظت نیتروژن برای جدایه‌های مورد ارزیابی در محدوده $1/65 \mu\text{g ml}^{-1}$ تا $13/32$ برآورد گردید. بیشترین میزان تولید نیتروژن مربوط به جدایه‌های g19l و W بود که به ترتیب معادل $13/32 \mu\text{g ml}^{-1}$ و $12/49 \mu\text{g ml}^{-1}$ برآورد گردید. همخوانی بسیار خوب داده‌های حاصل از روش طیف‌سنجی و رنگ‌سنجی مؤید کارایی روش مذکور به‌منظور غربال‌گری دقیق و ساده سویه‌های باکتریایی دیازوتروف بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی، روش‌های رنگ‌سنجی، کودهای زیستی، گوشی هوشمند

لایق حقیقی م.، محمدی ع.، موسیوند م.، تیزجنگ ا. ۱۴۰۴. غربال‌گری باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مبتنی بر روش رنگ‌سنجی نوین. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۱۳، شماره ۳. صفحه: ۷۹-۹۳.

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران (مکاتبه کننده مشترک)

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران (مکاتبه کننده اصلی)

۴- کارشناس گروه بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

* پست الکترونیک: a.mohammadi@alzahra.ac.ir ، m.mousivand@abrii.ac.ir

مقدمه

نیتروژن یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محدودکننده رشد گیاهان در سراسر جهان محسوب می‌شود که به‌طور معمول با مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی تأمین می‌گردد. افزایش نرخ رشد جمعیت منجر به مصرف فزاینده کودهای شیمیایی مختلف به‌ویژه کودهای نیتروژن‌دار شده که ضمن افزایش قیمت محصولات کشاورزی، متعاقباً آثار نامطلوب زیست‌محیطی از قبیل آلودگی نترات آب‌های سطحی و زیرزمینی، انتشار گازهای گلخانه‌ای و تغییرات چرخه جهانی نیتروژن را به همراه داشته است (Bhattacharjee et al., 2008).

در سال‌های اخیر جایگزینی کودهای شیمیایی با روش‌های ایمن و کم‌هزینه‌ای نظیر تولید کودهای زیستی مبتنی بر میکروارگانیسم‌های دیازوتروف که قادرند با احیای نترات قابلیت دسترسی گیاهان به مواد غذایی را به‌صورت مؤثری افزایش دهند منجر به توسعه بازار جهانی این فراورده‌های زیستی شده است (Romanya & Casals, 2020). بازار جهانی کودهای زیستی نیتروژن‌دار تا سال ۲۰۱۶ به ۸۰۰ میلیون دلار رسید و پیش‌بینی می‌شود تا پایان سال ۲۰۲۴، با نرخ رشدی معادل ۱۴/۳ درصد به ۳ میلیارد دلار برسد (Soumare et al., 2020).

در کنار باکتری‌های *Azotobacter*، *Rhizobium* و *Azospirillum* که به‌عنوان تثبیت‌کنندگان زیستی نیتروژن شناخته‌شده‌اند، طیف وسیعی از باکتری‌های جنس *Bacillus* با توان تثبیت نیتروژن نیز معرفی شده‌اند. این باکتری‌ها به دلیل تولید اندوسپور، هورمون‌های محرک رشد، سیدروفور و طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی به گزینه‌ی مناسبی برای تولید تجاری کودهای زیستی باقابلیت کاربری چندگانه تبدیل شده‌اند (Jain et al., 2021). شناسایی گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* با توان تثبیت نیتروژن در پژوهش‌های متعدد (Singh et al., 2020; Yang et al., 2023)، افزایش میزان تثبیت نیتروژن سویه‌های باکتریایی نظیر *Azotobacter* و *Rhizobium* در کنسرسیوم با سویه‌های مذکور (Leroux et al., 2024; Sibponkrung et al., 2020) و توانایی افزایش رشد گیاه و کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط آن‌ها، بهره‌برداری از این جنس و به‌ویژه گونه ایمن *B. subtilis* را در توسعه کودهای زیستی موردتوجه قرار داده است (Jain et al., 2021).

غربال سویه‌های میکروبی تثبیت‌کننده نیتروژن با هدف توسعه کودهای زیستی به روش‌های مختلفی چون سنجش احیای استیلن (Schollho & Burris, 1966)، استفاده از ایزوتوپ نشان‌دار N^{15} ، روش کج‌دال (Ebrahimi et al., 2017)، ردیابی مولکولی ژن کد کننده زیر واحد پروتئینی آنزیم نیتروژناز (*nif*) (Gaby & Buckley, 2012) و کشت در محیط‌های عاری از نیتروژن انجام می‌شود (Dalton & Kramer, 2006; Saribay, 2003). اگرچه روش‌هایی چون احیای استیلن، ردیابی مولکولی و ایزوتوپ نشان‌دار از دقت و حساسیت بالایی برخوردار هستند، اما نیاز به تجهیزات پیشرفته‌ای چون گاز کروماتوگرافی، طیف‌سنجی جرمی N^{15} و دستگاه PCR از یک‌سو و نیاز به نیروی متخصص کارشناس از سوی دیگر مانع از کاربرد تکنیک‌های مذکور در سطح گسترده و در آزمایشگاه‌های مختلف شده است (Cordova-Rodriguez et al., 2022). روش کج‌دال نیز روشی زمان‌بر و دشوار است که استفاده از آن به دلیل نیاز به انجام مراحل هضم، تقطیر و تیتراسیون، وابستگی به وجود دستگاه و تجهیزات و نیز ضرورت وجود نیروی متخصص، مقرون‌به‌صرفه نیست (Sáez-Plaza et al., 2013). باین‌حال غربال‌گری سویه‌های باکتریایی دیازوتروف در تحقیقات داخلی کشور عمدتاً مبتنی بر روش‌های مذکور است. بررسی توانایی تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی در سویه‌های *Azotobacter* (Nosrati et al., 2014)، *Nostoc ellipsosporum* و *N. muscorum* (Ahmadi, M. & Nourouzi, 2008)، *Rhizobium meliloti* (Moqtadar et al., 2005) و *Azospirillum spp* (Akhavan sepahey et al., 2009)، از جمله ارزیابی‌های انجام‌شده با روش احیای استیلن است. غربال‌گری مولکولی سویه‌های باکتریایی *Bacillus* با هدف ردیابی مولکولی ژن نیتروژناز (Yavarian et al., 2024)، بررسی تنوع و فراوانی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن قابل‌کشت در فیلوسفر ذرت (Abadi et al., 2021)، ردیابی مولکولی سویه‌های باکتریایی تثبیت‌کننده نیتروژن متعلق به جنس‌های *Azospirillum*، *Herbaspirillum* و *Pseudomonas* (Reinhardt et al., 2008) و ردیابی مولکولی سویه‌های باکتریایی *Pseudomonas* با پتانسیل تثبیت نیتروژن در ریزوسفر برنج (Mirza et al., 2006)، از جمله مطالعات انجام‌شده

محیط کشت باکتریایی آب پپتونه از زرد به قرمز با افزودن معرف نسلر (Abdelwahed et al., 2021) به‌عنوان روش‌های طیف‌سنجی با هدف تخمین ظرفیت تثبیت نیتروژن زیستی موردتوجه قرار گرفته‌اند. تخمین کمی میزان تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی در سویه‌های باکتریایی *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* و *Kosakonia oryzae* با روش اسپکتروفتومتری و مبتنی بر تغییر رنگ محیط کشت از سبز به آبی (Cordova et al., 2022) و اندازه‌گیری میزان کمی تولید یون آمونیوم در نه سویه باکتریایی متعلق به جنس‌های *Bacillus*, *Sporosarsina*, *Pseudomonas*, *Stappia*, *Priestia* و *Halomonas* به کمک معرف نسلر و روش طیف‌سنجی (Abdelwahed et al., 2022) از جمله مطالعات موفق انجام‌شده در این زمینه است.

با توجه به اینکه روش طیف‌سنجی نیازمند تجهیزات پیشرفته و گران‌قیمتی چون دستگاه اسپکتروفتومتری می‌باشد، لذا در سال‌های اخیر تلاش شده است تا روش‌های رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال در گوشی هوشمند به‌عنوان یک تکنیک کم‌هزینه، سریع و قابل کاربرد در محل به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای اندازه‌گیری غلظت مولکول هدف معرفی گردد (Fan et al., 2021). دریافت تصویر با گوشی هوشمند و سپس تعیین کمیت رنگ با استفاده از نرم‌افزارهای خاص پردازش تصویر (از قبیل Color, Matlab, Image J, Adobe Photoshop, Grab و غیره) با استفاده از مدل‌های رنگی مناسب، از جمله مراحل اصلی در روش رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال مبتنی بر گوشی هوشمند همراه است. تاکنون مدل‌های رنگ‌سنجی مختلفی از جمله RGB (Red, Green, Blue)، CMY (Cyan, Magenta, Yellow) و HSV (Hue, Saturation, Value) و L^*a^*b (luminance, two chromatic components) توسعه یافته‌اند. در این میان، دو روش اول از محبوبیت و کاربرد بیشتری برخوردار هستند (Costa et al., 2015). ایجاد رابطه بین داده‌های کمی تصاویر و غلظت‌های مختلف آنالیت موردنظر، امکان ردیابی سریع، دقیق و مقرون‌به‌صرفه آنالیت را در محل و با هزینه پایین فراهم می‌کند (Fan et al., 2021).

در دهه گذشته طیف وسیعی از ترکیبات مهم زیستی و شیمیایی از قبیل فلزات سنگین (Kaoutit et al., 2013)،

با روش‌های مولکولی در زمینه غربال‌گری باکتری‌های دیازوتروف است. روش کج‌دال نیز یکی از تکنیک‌های آزمایشگاهی مهم در زمینه ارزیابی تثبیت نیتروژن محسوب می‌شود که به‌طور گسترده برای اندازه‌گیری نیتروژن کل در نمونه‌های گیاهی و مواد زیستی به کار می‌رود. ارزیابی تثبیت زیستی نیتروژن در برخی جدایه‌های *Azetobacter* (Leylasi & Sarikhani, 2018)، بررسی توانایی تثبیت زیستی نیتروژن در سویه‌های ریزوبیوم همزیست با بقولات (Eivazi et al., 2012)، سنجش میزان تثبیت نیتروژن در برخی جدایه‌های *Azetobacter* در مایه‌زنی ذرت (Leylasi & Sarikhani, 2017) و ارزیابی پتانسیل تثبیت نیتروژن در سویه‌های *Azetobacter* جداشده از خاک‌های کشاورزی (Kaviyarasan et al., 2020) از جمله پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه اندازه‌گیری تثبیت زیستی نیتروژن با استفاده از روش کج‌دال به شمار می‌آیند.

معرفی محیط‌های کشت عاری از نیتروژن با هدف غربال‌گری سریع و دقیق تعداد زیادی از سویه‌های باکتریایی با توان تثبیت زیستی نیتروژن از جمله روش‌های پرکاربرد و مرسوم در جداسازی باکتری‌های دیازوتروف به شمار می‌آید. معرفی محیط عاری از نیتروژن با هدف جداسازی باکتری‌های دیازوتروف *Azospirillum* در سال ۱۹۸۷ امکان جداسازی و غربال طیف وسیعی از باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن را فراهم نمود (Döbereiner & Pedrosa, 1987). استفاده از این نوع محیط‌های کشت همچنان از روش‌های غربال سویه‌های باکتریایی تثبیت‌کننده نیتروژن به شمار آمده و بررسی قابلیت تثبیت نیتروژن در دوازده سویه باکتریایی مؤثر از جمله جنس‌های *Acinetobacter*, *Pseudomonas* و *Comamonas* در محیط کشت بدون نیتروژن از جمله مطالعات انجام‌شده در این زمینه است (Khanghahi et al., 2021). استفاده از معرف‌هایی که به‌واسطه تغییر pH و تجمع یون‌های آمونیوم در این محیط‌ها منجر به تغییر رنگ می‌گردد به‌عنوان شاخص رشدی باکتری و توانایی تثبیت نیتروژن در نظر گرفته می‌شود (Baldani et al., 2014). در سال‌های اخیر بهره‌برداری از ویژگی تغییر رنگ محیط‌های کشت عاری از نیتروژن و حاوی معرف رنگی بروموتیمول بلو از سبز به آبی (Cordova-Rodriguez et al., 2022) یا تغییر رنگ

در نیم لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. سپس ۲ میلی لیتر محلول مغذی (شامل: ۰/۰۴ گرم بر لیتر $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱۲ گرم بر لیتر $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۴ گرم بر لیتر H_3BO_3 ، ۰/۱ گرم بر لیتر $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و ۱/۱۷۵ گرم بر لیتر $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) و ۲ میلی لیتر محلول برموتیمول بلو (شامل: ۵ گرم بر لیتر برموتیمول بلو در هیدروکسید پتاسیم ۰/۲ نرمال)، ۴ میلی لیتر محلول EDTA^3 (۱۶/۴ گرم بر لیتر (Fe-EDTA)، ۱ میلی لیتر محلول ویتامین (۱۰ میلی گرم بیوتین و ۲۰ میلی گرم pyridoxal-HCl در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) و ۴/۵ گرم هیدروکسید پتاسیم به محیط پایه اضافه و به حجم یک لیتر رسید. پس از تنظیم pH در ۶/۵، محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. شایان ذکر است که بعد از اتوکلاو و کاهش دمای محیط کشت به ۴۵ درجه سلسیوس، محلول ویتامین توسط فیلتر ۰/۲ استریل و سپس به محیط اضافه گردید. تغییر رنگ در این محیط از سبز به آبی به عنوان شاخصی برای غربال باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن شناخته می شود. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته سویه های باکتریایی در محیط TSB^4 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=0.4$) به محیط کشت NFB تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور rpm ۱۸۰ گرمخانه گذاری شد. سپس سوسپانسیون باکتری با دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و میزان جذب مایع رویی در ۶۱۰ نانومتر قرائت شد (Baldani et al., 2014).

بهینه سازی فرایند تخمین میزان کمی تثبیت نیتروژن با هدف تعیین میزان کمی تثبیت نیتروژن مولکولی در سویه های باکتریایی از روش اسپکتروفتومتری و ارزیابی تغییرات میزان جذب محیط کشت NFB در غلظت های مختلف یون آمونیوم استفاده شد (Cordova-Rodriguez et al., 2022). به منظور ترسیم نمودار استاندارد، حجم های مختلفی از محلول آمونیومی به هر لوله آزمایش اضافه و حجم نهایی توسط محیط کشت NFB به سه میلی لیتر رسانده شد. سپس از هر لوله به میزان ۲۰۰ μl داخل چاهک ریخته و میزان جذب در ۶۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (سوئیس، Tecan impro200) (Baldani et al., 2014).

علف کش ها (Pohanka et al., 2018)، آفت کش ها (Sicard et al., 2015) و آنتی بیوتیک ها (Masawat et al., 2015) با استفاده از تکنیک رنگ سنجی تصویر دیجیتال با موفقیت مورد مطالعه و ردیابی قرار گرفته اند. استفاده موفق از این استراتژی برای ردیابی غلظت نترات (Muslimzadeh et al., 2020) و فنل (al., 2019) در نمونه های آبی از جمله موارد بهره برداری از روش مذکور در مطالعات داخلی است.

تاکنون پژوهشی در خصوص استفاده از روش طیف سنجی و نیز توسعه روش رنگ سنجی نوین با هدف تخمین میزان کمی غلظت یون آمونیوم انجام نشده است. در پژوهش حاضر تلاش شد تا ضمن توسعه روش طیف سنجی برای غربال سویه های باکتریایی تثبیت کننده نیتروژن، با بهره برداری از داده های حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری برای توسعه روش رنگ سنجی نوین مبتنی بر گوشی هوشمند در فضا های رنگی RGB/HSV استفاده گردد.

مواد و روش ها

جدایه های باکتریایی

در این مطالعه 12 جدایه باکتریایی *Bacillus subtilis* موجود در کلکسیون میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ¹(WDCM843) و جدایه باکتریایی *Azotobacter chroococcum* CCSM-B00475 با تثبیت نیتروژن مولکولی مربوط به کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. به منظور فعال سازی، استوک جدایه های باکتریایی بر روی محیط کشت نوترینت آگار^۲ در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شد.

غربال گری نیمه کمی سویه های تثبیت کننده نیتروژن با روش طیف سنجی

با هدف ارزیابی توان تولید آمونیوم و تثبیت نیتروژن مولکولی از روش کشت سویه های باکتریایی در محیط کشت NFB حاوی معرف رنگی برموتیمول بلو استفاده شد (Baldani et al., 2014). برای تهیه محیط کشت مایع NFB ابتدا ۵ گرم مالیک اسید، ۰/۵ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۲ گرم MgSO_4 ، ۰/۱ گرم NaCl و ۰/۰۲ گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3- Fe- ethylenediaminetetraacetic acid

4- Tryptone soya broth

1- Membership code for the World Federation for Culture Collections

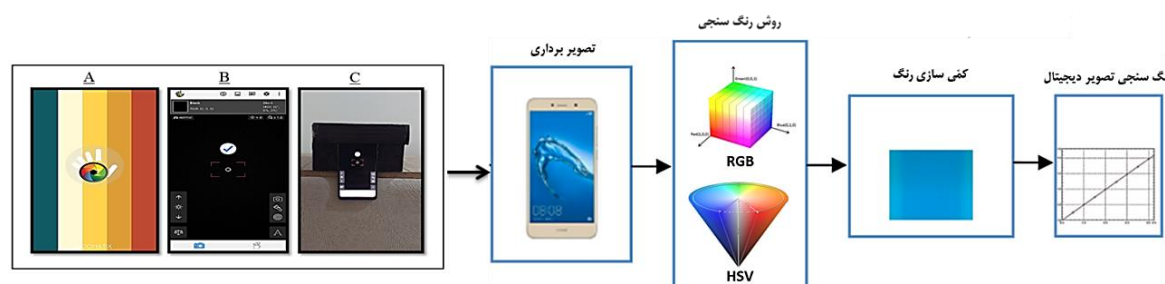
2- Nutrient Agar

پیکسل‌های تصویر توسط برنامه به هرکدام از مدل‌های رنگی، از بهترین مدل خطی برای نوشتن معادله و تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. برای تصویربرداری دیجیتال از دو سیستم باز و بسته استفاده شد. در سیستم باز فقط از تلفن همراه سامسونگ A73 مدل SM-A736B/DS برای تصویربرداری استفاده گردید، در سیستم بسته برای تصویربرداری یک جعبه مقوایی مستطیل شکل به ابعاد (۱۰×۱۷×۲۸ cm) ساخته و متناسب با اندازه گوشی جایگاه دوربین بر روی جعبه تعیین و سپس تصویربرداری انجام شد (Asgari & Gholkhani, 2018) (شکل ۱). در تصویربرداری از ویال‌های حاوی غلظت‌های مختلف هیدروکسید آمونیوم مورد استفاده در ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید. لازم به ذکر است که قسمت انتهایی جعبه، جایی که ویال‌ها قرار می‌گیرند، باید سفید باشد تا تأثیری بر رنگ محلول نداشته باشد. داده‌های حاصل از تصویربرداری و میزان جذب هر نمونه در OD با طول‌موج ۶۱۰ نانومتر برای ترسیم منحنی استاندارد رنگ‌سنجی استفاده شد.

قرائت و pH هر لوله اندازه‌گیری شد. به‌منظور بهینه‌سازی منحنی استاندارد نهایی، فاکتورهای مختلفی از جمله غلظت‌های مختلف منابع متفاوت آمونیومی (شامل آمونیوم نیترات (۲۰ mM تا ۱۴۰ mM)، نیتريت سدیم (۲۰ mM تا ۱۴۰ mM)، سولفات آمونیوم (صفر تا ۲۵ mM)، آمونیوم کلراید (صفر تا ۲۵ mM)، آمونیوم استات (صفر تا ۲۵ mM) و هیدروکسید آمونیوم (صفر تا ۲۵ mM)) و زمان شروع قرائت نمونه‌ها پس از افزودن منبع آمونیومی به محیط کشت در طول‌موج ۶۱۰ نانومتر (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه) مورد بررسی قرار گرفت (Cordova-Rodriguez et al., 2022).

طیف‌سنجی با گوشی هوشمند مبتنی بر نرم‌افزار رنگ‌سنجی

به‌منظور تبدیل داده‌های حاصل از طیف‌سنجی با اسپکتروفتومتری از نرم‌افزار رنگ‌سنجی و رایگان Color Grab (Version 3.9.2 (C) 2021 Loomatix Ltd) استفاده شد. در این برنامه از مدل‌های رنگی، RGB (Red, Green, blue) و HSV (Hue, saturation, brightness) استفاده می‌شود. پس از عکس‌برداری و تبدیل



شکل ۱- شماتیک روش رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال در گوشی‌های هوشمند؛ تصویر ورودی نرم‌افزار color grab (A)، فضای

داخلی نرم‌افزار color grab (B)، نحوه‌ی تعبیه گوشی بر روی جعبه و زاویه ۹۰ درجه بین میز و گوشی هوشمند (C)

Figure 1. Schematic of the digital colorimetry method using smartphones; input image in color grab software (A), interface of the color grab software (B), and positioning of the smartphone on the box with a 90-degree angle between the table and the smartphone (C).

درجات مختلف قابل ردیابی بود. بر اساس مشاهده چشمی میزان تغییر رنگ محیط، می‌توان تخمین زد که سویه‌های W, g19L, K53L, g6l و g19b در مقایسه با سایر سویه‌ها از پتانسیل تثبیت نیتروژن بالاتری برخوردارند. سویه شاهد نیز قادر به تغییر رنگ محیط از سبز به آبی بود. غربال‌گری کیفی سویه‌های باکتریایی تثبیت‌کننده نیتروژن با استفاده از محیط کشت NFB، نشان‌دهنده‌ی تفاوت‌های معناداری در توان تثبیت نیتروژن میان

نتایج و بحث

غربال‌گری کیفی سویه‌های باکتریایی تثبیت‌کننده نیتروژن

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، در محیط کشت NFB سویه‌های A15d و g33b تغییر رنگی مشاهده نشد؛ بر این اساس این سویه‌ها قادر به تثبیت زیستی نیتروژن نبودند. در ارتباط با سایر سویه‌های مورد ارزیابی، نتیجه آزمون مثبت برآورد شد که با تغییر رنگ محیط از سبز به آبی با

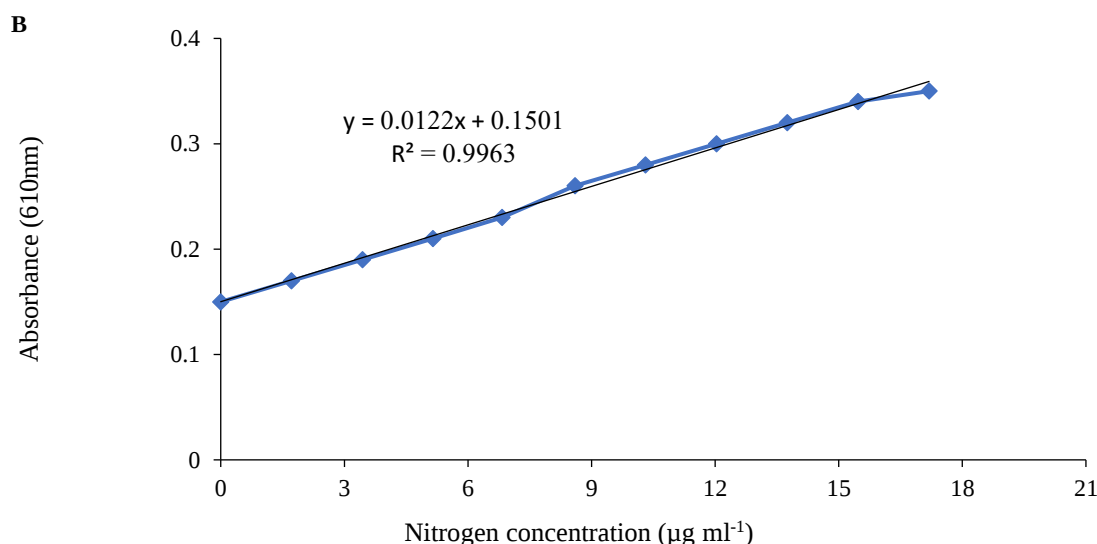
رنگ محیط از سبز به زرد در همین دامنه از غلظت، گزینه‌های مناسبی برای ترسیم منحنی استاندارد نبودند. بررسی منابع دیگر آمونیومی شامل آمونیوم کلراید، آمونیوم استات، سولفات آمونیوم و هیدروکسید آمونیوم در محدوده صفر تا ۲۵ mM نشان داد که در بازه مذکور افزایش یون آمونیوم منجر به کاهش اسیدیته و تغییر رنگ محیط از سبز به زرد کم‌رنگ گردید. با هدف بهینه‌سازی غلظت مناسب منبع آمونیومی به گونه‌ای که متناسب با میزان غلظت رنگ برموتیمول بلو در محیط کشت بوده و با افزایش تدریجی غلظت منجر به افزایش اسیدیته و تغییر رنگ محیط از سبز به آبی گردد، غلظت‌های مختلف منبع آمونیومی هیدروکسید آمونیوم در بازه ۱۹۷۰ mM تا ۱۳/۳۰ mM ارزیابی گردید. بر اساس نتایج و با توجه به اینکه همچنان اسیدیته کاهش یافته و رنگ محیط از سبز به زرد کم‌رنگ تغییر می‌نمود؛ ضرورت استفاده از بازه رقیق‌تری از غلظت آمونیوم هیدروکسید برای رسم منحنی استاندارد محرز گردید. نهایتاً ترسیم منحنی استاندارد با محلول هیدروکسید آمونیوم در بازه ۱۲۳ تا ۱۲۳۰ μM منجر به دستیابی به دامنه مناسبی از غلظت یون آمونیوم متناسب با غلظت رنگ برموتیمول بلو در محیط کشت NFB گردید (شکل ۲). همچنین اندازه‌گیری pH نشان داد که با افزایش غلظت هیدروکسید آمونیوم میزان اسیدیته افزایش یافته و از ۶/۷ در محیط پایه به ۹/۲ در بالاترین غلظت هیدروکسید آمونیوم می‌رسد.

سویه‌های مورد بررسی بود. در مطالعه مشابهی، استفاده از محیط‌های نیمه جامد فاقد نیتروژن به عنوان ابزاری کارآمد برای جداسازی و ارزیابی اولیه پتانسیل تثبیت زیستی نیتروژن سویه‌های باکتریایی معرفی شده است. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، این محیط‌ها علاوه بر توان جداسازی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن، تغییرات رنگی محیط را که ناشی از افزایش اسیدیته است به‌طور مؤثری نمایان ساخته و به دلیل سادگی و مقرون به صرفه بودن، به‌ویژه در شرایط آزمایشگاهی با منابع محدود، به عنوان گزینه‌ای مناسب برای پژوهشگران معرفی شده است (Baldani et al., 2014).

فرایند بهینه‌سازی و تخمین کمی میزان تثبیت نیتروژن
برآورد میزان تولید یون آمونیوم در محیط به صورت کمی با ترسیم منحنی استاندارد مبتنی بر میزان تغییرات رنگ محیط کشت NFB از سبز به آبی و تفاوت میزان جذب در طول موج ۶۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر انجام شد. به منظور ترسیم منحنی استاندارد، فاکتورهای مختلفی مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. مهم‌ترین مسئله در ترسیم نمودار استاندارد، یافتن محدوده‌ای از دامنه جذب در طول موج ۶۱۰ نانومتر بود که در آن رنگ محیط با افزایش تدریجی غلظت یون آمونیوم از سبز به آبی تغییر می‌یابد. بررسی منابع مختلف آمونیومی نشان داد که نیتريت سدیم به دلیل عدم توانایی در تغییر رنگ محسوس محیط کشت در محدوده ۲۰ mM تا ۱۴۰ mM و نیترات آمونیوم به دلیل اسیدی نمودن محیط و تغییر

A





شکل ۲- تغییر رنگ محیط کشت NFB از سبز به آبی با افزایش غلظت هیدروکسید آمونیوم (۰ تا ۱۲۳۰ میکرو مول) (A)، منحنی استاندارد تثبیت کمی نیتروژن بر اساس غلظت نیتروژن (μg ml⁻¹) در برابر میزان جذب در طول موج ۶۱۰ نانومتر (B)
Figure 2. Color Change of the NFB medium from green to blue with a gradual increasing in the ammonium hydroxide concentrations (0 to 1230 μmol) (A), standard curve for quantitative nitrogen fixation based on nitrogen concentrations (μg/ml) versus absorbance at 610 nm (B).

پژوهشگران این امکان را می‌دهد که بتوانند فعالیت تثبیت نیتروژن را در شرایط مختلف آزمایشگاهی و حتی در سطح میدانی به‌دقت و با تکرارپذیری بالا اندازه‌گیری کنند (Cordova-Rodriguez *et al.*, 2022). (Abdelwahed *et al.*, 2022)

بررسی زمان قرائت نمونه‌ها در بازه زمانی یک ساعت و با فاصله زمانی ۱۰ دقیقه نشان داد که میانگین میزان جذب در ۶۱۰ نانومتر پس از افزودن غلظت‌های مختلف منبع آمونیومی به محیط کشت NFB ثابت بوده و تغییر محسوسی ندارد. این نتایج نشان داد که میزان رنگ موجود در محیط کشت بلافاصله با آمونیوم موجود در محیط اشباع‌شده و تغییرات میزان جذب در طول زمان برای هر غلظت تقریباً ثابت و از نظر آماری ($p \leq 0/05$) معنی‌دار نیست. لذا منحنی استاندارد ترسیم‌شده از این نظر نیز مورد تأیید بوده و میزان جذب به‌دست‌آمده در لحظه صفر مبنای ترسیم منحنی استاندارد قرار گرفت (جدول ۱).

میزان جذب در طول موج ۶۱۰ نانومتر منطبق بر میزان نیتروژن در منبع آمونیومی، مبنای محاسبه میزان کمی تثبیت نیتروژن برای سویه‌های باکتریایی شد. به نظر می‌رسد غلظت معرف برم تیمول بلو موجود در محیط کشت با این میزان از منبع آمونیومی اشباع می‌گردد لذا افزایش غلظت معرف مورد استفاده در محیط کشت با هدف افزایش بازه غلظت منبع آمونیومی مورد استفاده در ترسیم منحنی استاندارد از جمله مواردی است که می‌تواند در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد. البته تأثیر افزایش غلظت معرف بر میزان رشد سویه‌های باکتریایی نیز باید در این نوع ارزیابی‌ها مدنظر قرار گیرد. شایان‌ذکر است که در مطالعات مشابه، استفاده از روش طیف‌سنجی به‌عنوان یک ابزار مکمل برای بررسی دقیق‌تر توان تثبیت نیتروژن در سویه‌های باکتریایی که در ارزیابی کیفی منجر به تغییر رنگ محیط شده‌اند با موفقیت به‌کار گرفته شده است. روش مذکور در مقایسه با ارزیابی‌های کیفی، دقت بالاتری در شناسایی و رتبه‌بندی سویه‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی فراهم نموده و به

جدول ۱- تأثیر زمان قرائت میزان جذب محیط کشت NFB در ۶۱۰ نانومتر پس از افزودن غلظت‌های مختلف هیدروکسید آمونیوم (صفر تا ۱۲۳۰ μM).

Table 1. The effect of reading time on the absorbance of NFB culture medium at 610 nm after the addition of various concentrations of ammonium hydroxide (0 to 1230 μM)

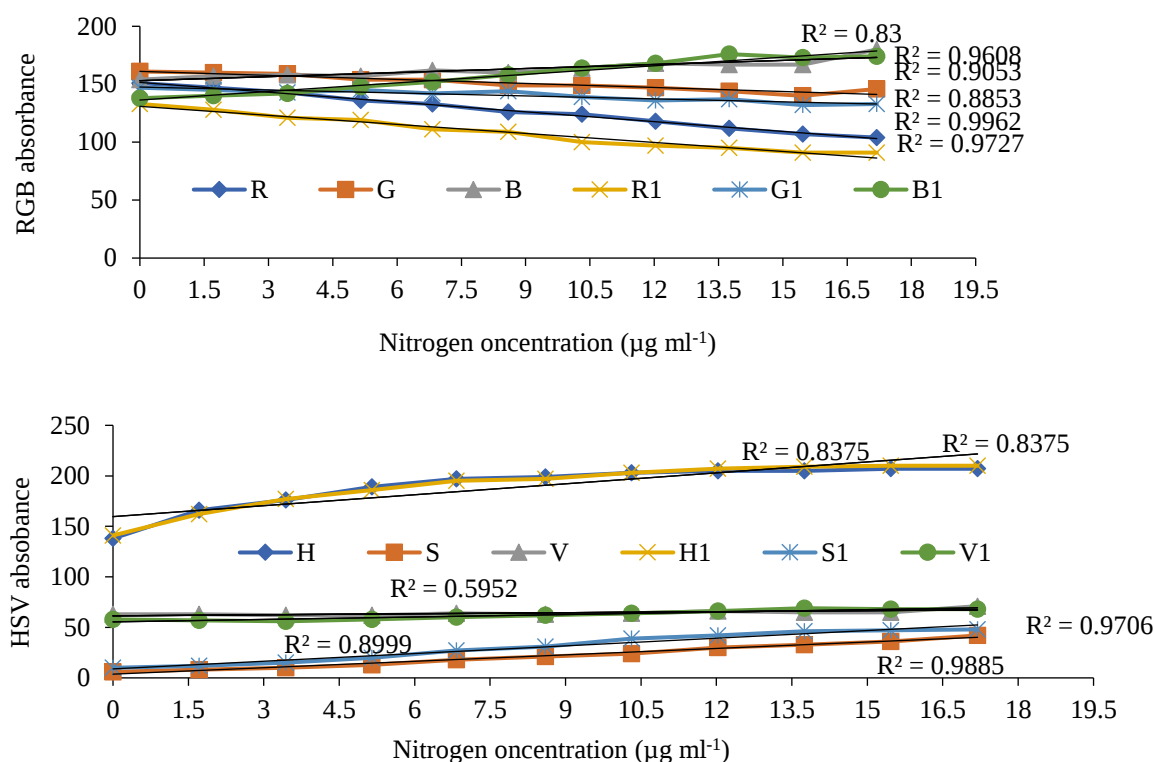
The absorbance of NFB culture medium at 610 nm							
$\text{NH}_4\text{OH}(\mu\text{M})$	0 (min)	10 (min)	20 (min)	30 (min)	40 (min)	50 (min)	60 (min)
0	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
122	0.16	0.17	0.17	0.17	0.17	0.18	0.18
245	0.18	0.18	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
368	0.21	0.21	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22
488	0.23	0.24	0.23	0.24	0.24	0.24	0.24
614	0.26	0.26	0.26	0.26	0.25	0.25	0.25
736	0.28	0.28	0.28	0.28	0.27	0.27	0.27
860	0.3	0.3	0.3	0.3	0.29	0.29	0.29
982	0.32	0.32	0.32	0.31	0.31	0.31	0.31
1105	0.33	0.33	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32
1230	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.33	0.33

اندازه‌گیری نیمه کمی تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی مبتنی بر روش رنگ‌سنجی با گواشی هوشمند

با هدف تسهیل غربال‌گری نیمه کمی جدایه‌های باکتریایی تثبیت‌کننده نیتروژن با روش رنگ‌سنجی نوین، منحنی استاندارد برای شاخص‌های RGB و HSV در محدوده صفر تا ۱۲۳۰ میکرومول محلول هیدروکسید آمونیوم در دو سیستم باز و بسته ترسیم شد. بررسی شیب نمودار در شش شاخص موردبررسی (R, G, B, H, S و V) و در دو فضای باز و بسته نشان داد که نمودارهای حاصل از ترسیم در همه پارامترها به جز V از شیب مناسبی برخوردار می‌باشند. همچنین نتایج نشان داد که در مقایسه با سایر آیت‌ها دو شاخص R و S از مقادیر قابل قبولی از R^2 در هر دو فضای باز و بسته برخوردار بوده ($R^2 \geq 0.97$) و می‌توانند کاندیدای مناسبی برای ترسیم منحنی استاندارد باشند. با توجه به مثبت بودن شیب منحنی مربوط به شاخص S و همخوانی بیشتر با داده‌های

افزایشی جذب حاصل از طیف‌سنجی با روش اسپکتروفتومتری، آیت مذکور به‌عنوان شاخص مناسب برای تخمین میزان کمی تثبیت نیتروژن معرفی شد. همچنین بر اساس نتایج، انجام ارزیابی در فضای بسته منتج به نتایج قابل قبول‌تر و منحنی استاندارد مناسب‌تری گردید که ناشی از حذف اثرات جانبی فاکتورهای محیطی تأثیرگذار است. باین‌حال در این پژوهش اندازه‌گیری آیت‌های RGB و HSV در فضای باز نیز نتایج تقریباً مشابهی داشت که برای سهولت کاربری قابل توصیه است (شکل ۳).

تمام آیت‌های مدل رنگ‌سنجی HSV، در هر دو فضای باز و بسته، متناسب با افزایش غلظت نیتروژن روند افزایشی (شیب مثبت) داشتند. در نتیجه، این مدل رنگ‌سنجی در مقایسه با مدل RGB برای اندازه‌گیری میزان نیمه کمی نیتروژن مدل مناسب‌تری است.



شکل ۳- نمودار استاندارد حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های RGB (Red, green, Blue) و HSV (Hue, Saturation, Value) در دو فضای بسته و باز در برابر غلظت‌های مختلف نیتروژن ($\mu\text{g ml}^{-1}$) با نرم‌افزار Color grab. شاخص‌های اندازه‌گیری شده در فضای باز با اندیس یک مشخص شده‌اند.

Figure 3. Standard graph obtained from measuring HSV (Hue, Saturation, Value) and RGB (Red, Green, Blue) indices in two closed and open system against various nitrogen concentrations ($\mu\text{g ml}^{-1}$) using Color Grab software. The measured indices in the open system are indicated with index one.

ریدیابی علف‌کش مذکور در نمونه‌هایی چون آب‌لوله‌کشی، پلاسمای موش و سرم انسانی قابل‌مقایسه با میکروپلیت‌خوان تجاری بود و برای تشخیص سریع، ارزان و در محل علف‌کش‌ها در ارزیابی محیط‌زیست و پایش زیستی مناسب است (Wang *et al.*, 2017). ردیابی و تعیین غلظت آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (Sicard *et al.*, 2015) و متیل پاراتیون (Guo *et al.*, 2015) با روش رنگ‌سنجی نوین مبتنی بر گوشی هوشمند همراه از جمله مطالعات موفق انجام‌شده در این زمینه است که به ترتیب مبتنی بر مدل رنگی RGB و CMYK بودند. با مقایسه‌ی مطالعات مختلف در حوزه رنگ‌سنجی نوین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از این پلتفرم‌ها در کنار روش‌های رنگ‌سنجی سنتی می‌تواند به‌عنوان یک راه‌حل ساده، سریع و مؤثر برای آنالیز غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی و میکروبی در محیط‌های مختلف از جمله

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در راستای بهره‌برداری از گوشی‌های هوشمند برای انجام آنالیزهای شیمیایی و میکروبی انجام‌شده که همگی مؤید کارآمد بودن روش رنگ‌سنجی دیجیتال در شرایط آزمایشگاهی و نیز در محل می‌باشند. رنگ‌سنجی تصاویر دیجیتال غشاهای حسگری با هدف ردیابی و تعیین غلظت یون جیوه در محیط‌های آبی و کمی‌سازی غلظت‌های یون جیوه در محدوده میلی‌مولار تا نانومولار از جمله مطالعات انجام‌شده در این حوزه است (Kaoutit *et al.*, 2013). در بررسی دیگری یک دستگاه رنگ‌سنجی پرتابل نواری مبتنی بر گوشی هوشمند و نرم‌افزار یامرا^۱ توسعه یافت که با ابعاد کوچک، قیمت پایین و بهره‌برداری از دو رنگ مختلف متیلن بلو و رودامین B قادر بود به‌طور هم‌زمان علف‌کش توفوردی را در محدوده غلظت یک تا ۸۰ ppb در مقیاس میکرولیتری ردیابی نماید. نتایج این پلتفرم در

تخمین زده شد. دو سویه A15d و g33b قادر به تثبیت نیتروژن نبودند (شکل ۴ و جدول ۲). در مطالعه مشابهی از روش طیفسنجی مبتنی بر معرف نسلر برای سنجش کمی تثبیت نیتروژن زیستی در نه جدایه *Bacillus* استفاده شد و نتایج نشان داد که تمام جدایه‌ها قادر به تولید یون آمونیوم می‌باشند. بیشترین میزان یون آمونیوم توسط سویه *B. inaquosum* تولید شد که معادل $371 \mu\text{M}$ برآورد گردید. همچنین نتایج بررسی مذکور نشان داد که روش طیفسنجی در مقایسه با روش‌های مرسوم ۱۰ برابر ارزان‌تر و ۲۶ برابر سریع‌تر است (Abdelwahed et al., 2022). در بررسی مشابه دیگری، غربال‌گری کمی سویه‌های باکتریایی دیازوتروف به کمک روش طیفسنجی مبتنی بر معرف برموتیمول بلو با موفقیت انجام شد. محدوده تثبیت نیتروژن توسط سویه‌های دیازوتروف در این بررسی $18/33$ تا $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Cordova-Rodriguez et al., 2022) برآورد گردید.

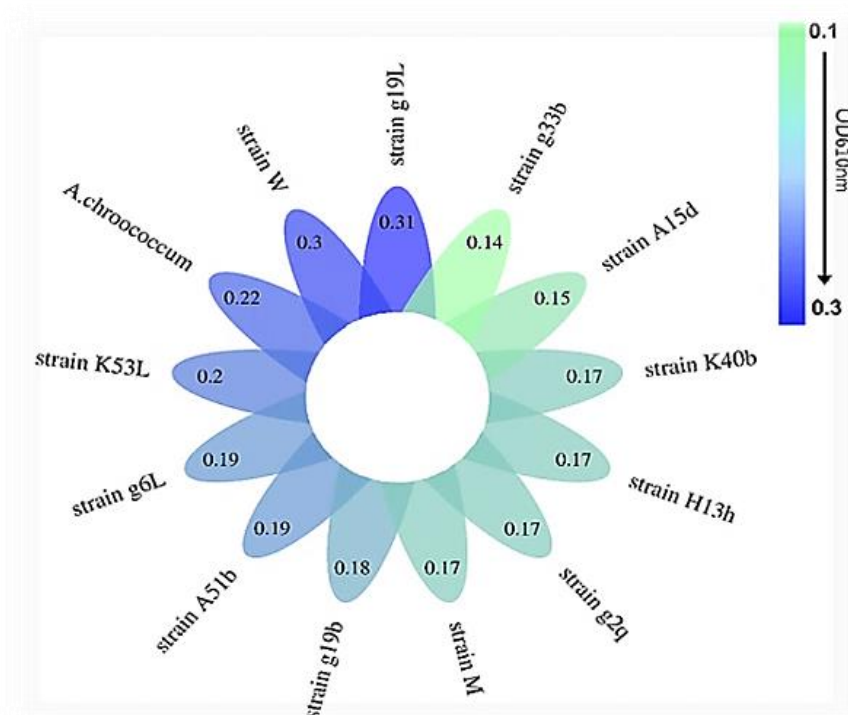
کشاورزی، کنترل کیفیت آب و مواد غذایی باشد. با توجه به دقت و صحت بالای روش رنگ‌سنجی پیشنهادشده در پژوهش حاضر برای تخمین میزان آمونیوم، به نظر می‌رسد که این روش می‌تواند به عنوان یک ابزار مناسب برای غربال‌گری آزمایشگاهی و نیز ارزیابی میدانی میکروارگانیسم‌های دیازوتروف باشد.

تخمین کمی تثبیت نیتروژن در سویه‌های باکتریایی

از روش اسپکتروفتومتر برای تخمین کمی تثبیت نیتروژن در سویه‌های *B. subtilis* به همراه سویه استاندارد *A. chroococcum* استفاده شد. میزان جذب سویه‌ها پس از ۴۸ ساعت رشد در محیط NFB در طول موج 610 نانومتر ثبت و با استفاده از منحنی استاندارد میزان تثبیت نیتروژن محاسبه گردید. بر اساس نتایج دامنه تثبیت نیتروژن برای سویه‌های مورد ارزیابی در محدوده $1/66$ تا $13/32 \mu\text{g ml}^{-1}$ برآورد گردید. بیشترین میزان تولید نیتروژن مربوط به سویه‌های g19l *B. subtilis* و *B. subtilis w* بود که به ترتیب معادل $13/32 \mu\text{g ml}^{-1}$ و $12/49 \mu\text{g ml}^{-1}$ برآورد گردید. میزان تثبیت نیتروژن در سویه استاندارد *A. chroococcum* معادل $5/83 \mu\text{g ml}^{-1}$

جدول ۲- تخمین میزان کمی تثبیت نیتروژن ($\mu\text{g ml}^{-1}$) در سویه‌های باکتری با روش طیفسنجی (طول موج 610 نانومتر)
Table 2. Estimation of quantitative nitrogen fixation ($\mu\text{g ml}^{-1}$) in bacterial strains using spectrophotometry (610 nm wavelength).

Bacterial strain	OD (610nm)	Nitrogen concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$) OD ₆₁₀
<i>B. subtilis</i> g19L	0.31	13.33
<i>B. subtilis</i> W	0.3	12.49
<i>A. chroococum</i>	0.22	5.83
<i>B. subtilis</i> K53L	0.2	4.16
<i>B. subtilis</i> g6L	0.19	3.33
<i>B. subtilis</i> A51b	0.19	3.33
<i>B. subtilis</i> g19b	0.18	2.49
<i>B. subtilis</i> g2q	0.17	1.66
<i>B. subtilis</i> H13h	0.17	1.66
<i>B. subtilis</i> K40b	0.17	1.66
<i>B. subtilis</i> M	0.17	1.66
<i>B. subtilis</i> A15d	0.15	0.00
<i>B. subtilis</i> g33b	0.14	0.00



شکل ۴- نقشه حرارتی میزان کمی تثبیت نیتروژن در سویه‌های باکتریایی *Bacillus subtilis* و سویه استاندارد *Azotobacter chroococcum* مبتنی بر میزان جذب محیط کشت NFB حاوی کشت ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه در ۶۱۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد.

Figure 4 . Heatmap of the quantitative estimation of nitrogen fixation in the bacterial strains *Bacillus subtilis* and the standard strain *Azotobacter chroococcum*, based on the absorbance of the NFB culture medium containing a 48-hour culture of the studied bacterial strains at 610 nm, using the standard curve.

ترسیم‌شده برای شاخص S مبتنی بر غلظت نیتروژن ($\mu\text{g ml}^{-1}$)، میزان تثبیت نیتروژن برای سه سویه مورد بررسی به ترتیب معادل ۵/۳۳، ۳/۴۴ و ۱/۵ $\mu\text{g ml}^{-1}$ برآورد شد که منطبق بر نتایج حاصل از اسپکتروفوتومتری بوده و قادر به تمایز و غربال سویه‌های باکتریایی بر اساس میزان کمی تثبیت نیتروژن بود (جدول ۳).

با هدف تأیید نتایج حاصل از رنگ‌سنجی دیجیتال مبتنی بر گوشی هوشمند همراه، شاخص S برای سویه‌های *A.chroococcum* A51b و g33b به ترتیب به عنوان سویه استاندارد، سویه مثبت و سویه منفی محاسبه و معادل ۱۵، ۱۱ و ۷ برآورد گردید. بر اساس منحنی استاندارد

جدول شماره ۳- برآورد میزان تثبیت نیتروژن ($\mu\text{g ml}^{-1}$) با استفاده از منحنی‌های استاندارد مبتنی بر داده‌های اسپکتوفوتومتری در ۶۱۰ نانومتر و نیز شاخص S با روش رنگ‌سنجی دیجیتال برای سویه استاندارد *Bacillus subtilis* strain A51 (سویه مثبت) و *B. subtilis* strain g33b (سویه منفی)

Table 3. Estimation of nitrogen fixation ($\mu\text{g ml}^{-1}$) using standard curves based on spectrophotometric data at 600 nm and also index S using digital colorimetry for the standard strain *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis* strain A51 (positive strain) and *B. subtilis* strain g33b (negative strain)

Bacterial strain	OD ₆₁₀	S index	N ($\mu\text{g ml}^{-1}$) OD ₆₁₀	N ($\mu\text{g ml}^{-1}$) S index
<i>A.chroococcum</i>	0.22	15	5.83	5.33
<i>B. subtilis</i> A51b	0.19	11	3.33	3.44
<i>B. subtilis</i> g33b	0.14	7	0.00	1.56

نتیجه‌گیری کلی

تلاش برای توسعه روش‌های ساده، دقیق و ارزان‌قیمت به کمک روش‌های رنگ‌سنجی نوین گام عملیاتی مهمی در راستای جایگزینی تکنیک‌های طیف‌سنجی مبتنی بر اسپکتروفتومتری به شمار می‌رود که در حوزه بیوتکنولوژی میکروبی در ابتدای مسیر قرار دارد. در این راستا بهره‌برداری از نرم‌افزارهای رنگ‌سنجی رایگان و پتانسیل گوشی‌های هوشمند همراه به‌عنوان ابزاری پرکاربرد و قابل‌دسترس در اندازه‌گیری غلظت مولکول‌های هدف موردتوجه ویژه محققین قرار گرفته است (Fan et al., 2021). با توجه به پیچیدگی فرایند اندازه‌گیری کمی نیتروژن در ارزیابی‌های مختلف از جمله غربال زیستی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن، در این پژوهش روش رنگ‌سنجی نوین مبتنی بر گوشی هوشمند توسعه یافت. این روش با تبدیل داده‌های حاصل از طیف‌سنجی به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری به شاخص‌های RGB و HSV، امکان اندازه‌گیری غلظت نیتروژن را به کمک گوشی هوشمند همراه و نرم‌افزار رایگان Color grab فراهم نمود. ارزیابی ۱۲ سویه باکتریایی *B. subtilis* به همراه سویه استاندارد *A. chroococcum* و تخمین میزان کمی تثبیت زیستی نیتروژن به کمک روش اسپکتروفتومتری و انطباق بسیار بالای نتایج حاصل از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر گوشی

هوشمند با داده‌های طیف‌سنجی مؤید اعتبار روش معرفی شده در غربال سویه‌های باکتریایی دیازوتروف بود که می‌تواند مورد استفاده محققین و نیز شرکت‌های دانش‌بنیان به‌منظور توسعه کودهای زیستی قرار گیرد. با توجه به کوتاه بودن مدت‌زمان ارزیابی، پایین بودن قیمت تمام‌شده، دقت بالای روش، قابلیت کاربرد در محل و پتانسیل ارزیابی تعداد زیادی از نمونه‌ها استراتژی مذکور می‌تواند گزینه مناسب و مقرون به صرفه‌ای برای غربال‌های آزمایشگاهی و حتی صنعتی به شمار آید. همچنین با توجه به نیاز به حجم کم نمونه مورد استفاده، عدم کاربرد معرف‌های خطرناکی چون نسلر یا ایزوتوپ‌های N^{15} می‌توان روش مذکور را در شمار روش‌های آزمایشگاهی سبز، دوستدار محیط‌زیست و مورد تأیید آژانس حفاظت از محیط‌زیست (APE) قرارداد. شایان‌ذکر است توسعه این دست از استراتژی‌ها برای بسیاری از ارزیابی‌های مبتنی بر رنگ‌سنجی در علوم زیستی می‌تواند زمینه‌ساز ارائه روش‌های سریع، ارزان‌قیمت و قابل‌دسترس گردد که جایگزینی روش‌های گران‌قیمت و نیازمند تجهیزات پیشرفته را با روش‌های ساده و عملیاتی امکان‌پذیر خواهد ساخت. بهینه‌سازی روش رنگ‌سنجی با ارزیابی توان تثبیت زیستی نیتروژن در طیف متنوع‌تری از سویه‌های مختلف باکتریایی به کمک مدل‌های مختلف گوشی‌های هوشمند و برنامه‌های جدید رنگ‌سنجی هدف مطالعات آتی خواهد بود.

References

- Abadi V., Sepehri M., Rahmani H., Dolatabad H., Shamshiripour M., and Khatabi B. 2021. Diversity and abundance of culturable nitrogen fixing bacteria in the phyllosphere of maize. *Journal of applied microbiology*, 131(2): 898-912. (In Persian)
- Abdelwahed S., Trabelsi E., Saadoui I., Kouidhi S., Masmoudi A. S., Cherif A., and Mosbah A. 2022. A new pioneer colorimetric micro-plate method for the estimation of ammonia production by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Main Group Chemistry*, 21(1): 55-68.
- Ahmadi M. A., and Nourouzi B. 2008. A new report of n fixation by two species of cyanobacteria. *Iranian Journal of Science and Technology Transaction A- Science*, 32(A2): 147-151 (In Persian)
- Akhavan sepahey A., Ibrahimi B., and Asgharzade, A. 2009. Nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp. isolated from tehran forest parks. *Journal of microbiology knowledge*, 1(1): 33-41 (In Persian)
- Asgari S, M., and Gholkhani M. 2018. Design and construction of a black box for spectrometry measurement experiments using smartphone colorimetry apps. *The 10th Iranian Chemistry Conference*. (In Persian)
- Baldani J. I., Reis V. M., Videira S. S., Boddey L. H., and Baldani V. L. D. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil*, 384: 413-431.
- Bhattacharjee R. B., Singh A., and Mukhopadhyay S. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes prospects and challenges. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(2): 199-209.

- Cordova-Rodriguez A., Rentería-Martínez M., López-Miranda C., Guzmán-Ortiz J., and Moreno-Salazar S. 2022. Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures. *MethodsX*, 9: 101917.
- Costa G.B., Fernandes D.D.S., Almeida V.E., Araújo T.S.P., Melo J.P., Diniz P.H.G.D., and Veras G. 2015. Digital image-based classification of biodiesel, *Talanta*, 139: 50–55.
- Dalton D., and Kramer S. 2006. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. *Plant-associated bacteria*, 105-130.
- Dobereiner J., and Pedrosa F. A. 1987. Nitrogen Fixing Bacteria in Non-leguminous Plants. *Science Tech*, Madison, WI, USA.
- Ebrahimi M., Safari A., Sarikhani M. R., Mohammadi A., Aliasgharzad N. 2017. Isolation, identification, and determination of plant growth promoting properties of *Azotobacteria* isolated from soil samples north-west of Iran under different land use. *Applied soil research*, 6(2): 27-42.
- Eivazi A.R., Fajri A., Rezazad M., Soleymannpour M., and Rezai m. 2012. Evaluation of potential of biological nitrogen fixation of *rhizobium* strains in legume crops in west azerbaijan province. *Iranian journal of crop sciences*, 13(52), 627-641 (In Persian)
- Fan Y., Li J., Guo Y., Xie L., and Zhang G. 2021. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*, 171, 108829.
- Gaby J.C., and Buckley D.H. 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS One*, 7(7):42149.
- Guo J., Wong J. X., Cui C., Li X., and Yu H. Z. 2015. A smartphone-readable barcode assay for the detection and quantitation of pesticide residues. *Analyst*, 140(16): 5518-5525.
- Jain S., Varma A., and Choudhary D. K. 2021. Perspectives on nitrogen-fixing *Bacillus* species. *Soil Nitrogen Ecology*, 62: 359-369.
- Kaoutit H. El., Estevez P., Garcia F.C., and Serna F. 2013. Sub-ppm quantification of Hg(II) in aqueous media using both the naked eye and digital information from pictures of a colorimetric sensory polymer membrane taken with the digital camera of a conventional mobile phone, *Anal. Methods*, 5 (1): 54–58.
- Kaviyarasan G. P., Shricharan S. P., and Kathiravan, R. P. 2020. Studies on isolation, biochemical characterization and nitrogen fixing ability of *Azotobacter* sp. isolated from agricultural soils. *International Journal of Scientific Engineering and Applied Science (IJSEAS)*, 6(11): 118-25.
- Khushmaram, L., Karimi A., and Sadeghi F. 2020. Nitrite measurement in different water samples by magnetic solid phase extraction and image processing using a mobile phone. *Applied research in chemistry*, 14(2): 57-65. (In Persian)
- Leroux J., Beauregard P.B., and Bellenger J. 2024. *Azotobacter vinelandii* N2 fixation increases in co-culture with the PGPR *Bacillus subtilis* in a nitrogen concentration-dependent manner. *Appl Environ Microbiol*, e01528-24.
- Leylasi M., and Sarikhani M. 2017. Investigation of Nitrogen Fixation Efficiency of Some *Azotobacter* Isolates by Maize Inoculation. *Journal of agricultural science and sustainable production*, 27(4): 51-63. (In Persian)
- Leylasi M., and Sarikhani M. R. 2018. Evaluation of Biological Nitrogen Fixation by *Azotobacter* isolates in solid and liquid LG medium by kjeldahl method. *Water and Soil Science*, 28(2): 207-218. (In Persian)
- Masawat P., Harfield A., and Namwong A. 2015. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk, *Food Chem*, 184: 23–29.
- Mirza M. S., Mehnaz S., Normand P., Prigent-Combaret C., Moënné-Loccoz Y., Bally R., and Malik K. A. 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 163-170.
- Moqtadar M., Farahmand A., Moazzami N., and Talebizadeh A. 2005. Selection of the most resistant and best nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti* native to Kerman province. *National Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran* (In Persian)
- Muslimzadeh M., Larki A., and Ghanemi K. 2019. Phenol measurement in smartphone samples based on digital colorimetry, National Conference on Industry, Trade and Marine Sciences, Khorramshahr (In Persian)
- Nosrati R., Owlia P., Saderi H., Rasooli I., and Malboobi M. A. 2014. Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iranian journal of microbiology*, 6(4): 285. (In Persian)

- Pohanka M., Zakova J., and Sedlacek I. 2018. Digital camera-based lipase biosensor for the determination of paraoxon, *Sens. Actuators B-Chem.* 273: 610–615.
- Reinhardt E., Ramos L., Manfio P., Barbosa R., Pavan C., and Moreira-filho A. 2008. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from brazilian agricultural plants at são paulo state. *Brazilian journal of microbiology*, 39: 414-422.
- Romanyà J., and Casals P. 2020. Biological nitrogen fixation response to soil fertility is species-dependent in annual legumes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(2): 546-556.
- Saribay G. F. 2003. Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum* in nitrogen-free and OMW containing medium. *Spesifikasi Kompos dari Sampah Organik Domestik*.
- Schollho R., and Burris, H. 1966. Study of intermediates in nitrogen fixation. In *federation proceedings* (vol. 25, no. 2 p 1, p. 710). 9650 rockville pike, bethesda, md 20814-3998: *federation amer soc exp biol*.
- Sáez-Plaza P., Navas M.J., Wybraniec S., Michałowski T., and García Asuero A. 2013. An overview of the Kjeldahl Method of nitrogen determination. Part II. Sample preparation, working scale, instrumental finish, and quality control. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 43: 224–272.
- Sicard C., Glen C., Aubie B., Wallace D., Jahanshahi-Anbuhi S., Pennings K., Daigger G. T., Pelton R., Filipe J.D. 2015. Tools for water quality monitoring and mapping using paper-based sensors and cell phones, *Water Res.* 70: 360–369.
- Singh R.K., Singh P., Li H.B., Song Q.Q., Guo D.J., Solanki M.K., Verma K.K., Malviya M.K., Song X.P., Lakshmanan. P., and Yang L.T. 2020. Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant–microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. *BMC Plant Biol*, 20: 1–21.
- Sibponkrung S., Kondo T., Tanaka K. 2020. Co-inoculation of *Bacillus velezensis* strain S141 and *Bradyrhizobium* strains promotes nodule growth and nitrogen fixation. *Microorganisms*, 8:678.
- Soumare A., Diedhiou A. G., Thuita M., Hafidi M., Ouhdouch Y., Gopalakrishnan S., and Kouisni L. 2020. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. *Plants*, 9(8): 1011.
- Wang Y., Zeinhom M. M., Yang M., Sun R., Wang S., Smith J. N., and Du D. 2017. A 3D-printed, portable, optical-sensing platform for smartphones capable of detecting the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Analytical chemistry*, 89(17): 9339-9346.
- Yaghoubi Khanghahi M., Strafella S., Allegretta I., and Crecchio C. 2021. Isolation of bacteria with potential plant-promoting traits and optimization of their growth conditions. *Current Microbiology*, 78: 464-478.
- Yang X., Wan Q., Wu D., Wang J., Abbas T., and Zhang Q. 2023. The impact of novel *Azotobacter Bacillus* sp. T28 combined sea buckthorn pomace on microbial community structure in paddy soil. *Environmental Research*, 224: 115548.
- Yavarian S., Jafari P., Akbari N., and Feizabadi M. 2024. Isolation and molecular identification of native plant growth-promoting *Bacillus* strains from the soil around Tehran province. *Journal of Microbial Biology*, 12(47): 17-37. (In Persian)