ارزیابی ویژگی‌های مهم افزایندگی رشد گیاه در باکتری‌های جدا شده از کودهای زیستی بارور۲، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین

بهمن خوش‌رو[۱]، محمدرضا ساریخانی*[۲]، ناصر علی‌اصغرزاد[۳]، پیمان زارع[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۰۵)

چکیده

کنترل کیفیت کودهای زیستی دارای جنبه‌های مختلفی است که توجه به ویژگی محرک رشدی گیاه جدایه‌های میکروبی موجود در کود از جمله این موارد است. در این پژوهش چهار نوع کود زیستی رایج در کشور شامل بارور۲، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت و جدایه‌های مورد استفاده در آن‌ها Ba1 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس و N1، N2، N3 ، N4 و N5 از نیتروکسین در شرایط آزمایشگاهی از نظر انحلال فسفات معدنی و معدنی کردن فسفر آلی به روش کیفی و کمی، تولید اکسین، آزادکنندگی پتاسیم و تولید سایدروفور به دو روش کیفی و کمی ارزیابی شدند. در ویژگی انحلال فسفات معدنی از تری‌کلسیم فسفات به دو روش کیفی و کمی، جدایهBa1 با ایجاد بیشترین نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی (۳/۲) و انحلال فسفات به میزان ۶۰۶/۴ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین توان انحلال فسفر بود، این در حالی است که دیگر جدایه بارور۲ (Ba2) با معدنی کردن فسفات به‌مقدار ۶۲/۲ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین توان رهاسازی فسفر از اینوزیتول هگزافسفریک اسید بود. بیشترین تولید اکسین در میان جدایه‌ها در جدایه N4 با ۱۵/۱ میلی‌گرم بر لیتر دیده شد و جدایه N3 از نظر تولید سایدروفور به دو روش کیفی (تولید هاله نارنجی) و کمی (۱۲۴/۵میکرومولار) دارای بیشترین تولید سایدروفور بود. از نظر ویژگی آزادسازی پتاسیم از کانی‌های میکای موسکویت و بیوتیت به‌ترتیب جدایه Ba1 و Bio1 دارای بالاترین توان آزادکنندگی بودند. از نظر ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه، کودهای بارور۲ و نیتروکسین وضعیت خوبی داشتند و کود زیستی بیوسوپرفسفات در رتبه بعدی قرار داشت ولی در مورد کود زیستی سوپرنیتروپلاس وضعیت مطلوبی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: PGPR، کود زیستی، حل‌کننده فسفات، تولید اکسین و سایدروفور

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تبریز
۲- استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تبریز (مکاتبه کننده)
۳- استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تبریز
۴- عضو هیات علمی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
* پست الکترونیک مکاتبه کننده: rsarikhani@yahoo.com

مقدمه

کود زیستی یا بیولوژیک اصطلاحاً به مواد حاوی ریزجاندارانی اطلاق می‌شود که هنگامی‌که بر روی بذر، سطح ریشه و یا در خاک استفاده شود موجب تحریک و افزایش رشد گیاه می‌شود (Vessey, 2003). کودهای زیستی یکی از مهم‌ترین اجزاء کشاورزی آلی و پایدار محسوب می‌شوند که استفاده صحیح از آن‌ها می‌تواند ضمن افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات کشاورزی و کاهش مصرف بعضی از انواع کودهای شیمیایی، حفظ محیط زیست را نیز به‌دنبال داشته باشد (Leach & Mumford, 2008). هدف اصلی از توسعه فناوری زیستی در خصوص باکتری‌های محرک رشد گیاه، افزایش جمعیت باکتری‌های مؤثر در خاک است که می‌تواند به توسعه کشاورزی پایدار کمک کند و نیاز به استفاده از کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها را کاهش دهد (Adesemoye & Kloepper, 2009).

اصطلاح باکتری‌های محرک رشد گیاه یا PGPR[1] برای اولین بار توسط کلوپر و شروث[2] در سال ۱۹۷۸ برای باکتری‌های ریزوسفری متعلق به گروه *سودوموناس‌های فلورسنت* (گونه‌های *فلورسنس و پوتیدا*) وضع گردید. امروزه این اصطلاح برای دیگر باکتری‌های خاک که در ریزوسفر گیاه به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به‌کار می‌رود.

در بررسی گونه‌های مؤثر PGPR با ویژگی‌های متعدد، جنس‌های مختلف باکتری‌ها نتایج قابل قبولی نشان داده‌اند و از این میان جنس‌های باکتریایی شامل *Azotobacter*، *Pseudomonas*، *Rhizobium* و *Bacillus* به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند (Teaumroong *et al*, 2010). برخی از مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم باکتری‌های PGPR عبارتند از: تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفات‌های نامحلول، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد، تولید سایدروفور، آنزیم ACC-دآمیناز، حذف رقابتی پاتوژن‌ها یا حذف سوبستراهای فیتوتوکسیک تولیدشده به‌وسیله باکتری‌های آسیب‌رسان و ریشه‌های گیاه در شرایط تنش (Bashan & de-Bashan, 2010). با این حال باکتری‌های محرک رشد جداسازی شده از مکان‌های مختلف به‌دلیل عدم سازگاری مناسب با شرایط خاکی و اقلیمی مختلف، کارایی یکسانی ندارند. لذا شناسایی و به‌کارگیری باکتری‌های بومی محرک رشد گیاه می‌تواند سبب افزایش تولیدات کشاورزی گردد (Vikram *et al*, 2007). تلاش برای جداسازی و بکارگیری PGPR از اقداماتی است که به‌سرعت در حال گسترش بوده در تجاری‌سازی کودهای زیستی مشاهده می‌شود.

نظر به نتایج امیدوارکننده کودهای زیستی، در حال حاضر واحدهای متعددی از بخش‌های دولتی و خصوصی در کشور به تولید کودهای زیستی روی آورده‌اند، معرفی ریزوبیوم‌های بومی، تثبیت‌کننده‌های نیتروژن و باکتری‌های گوگردی، حل‌کننده‌های فسفر نظیر کودهای زیستی بارور۲ و نیتروکسین ازجمله دستاوردهای محققان در سال‌های اخیر است. بیوسوپرفسفات یا سوپرفسفات زیستی (سنگ فسفات به همراه گوگرد و باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد از جنس *تیوباسیلوس‌ها*) امروزه به‌عنوان کود زیستی فسفاته استفاده می‌شود. خوشبختانه دانش‌کشاورزان در خصوص مزایای استفاده از این‌گونه کودها نیز به‌شدت رو به گسترش است. با این وجود باید به خاطر داشت که تداوم استقبال کشاورزان از کودهای مذکور بستگی به کیفیت آن‌ها دارد (Teaumroong *et al.*, 2010). اطمینان از اثر بخشی هر محصول اولین حق هر مصرف کننده‌ای است که می‌بایستی از طریق سازمان‌ها و یا وزارتخانه‌های ذیربط تضمین گردد. کودهای زیستی نیز از این امر مستثنی نبوده و اطمینان از کیفیت ایگونه کودها، اولین حق هر کشاورز است که می‌بایستی از سوی مراجع ذیربط تضمین گردد. خوشبختانه در سال‌های اخیر درنتیجه تلاش محققان برخی سویه‌های PGPR در قالب کودهای زیستی تولید و در کشاورزی کشور مورد استفاده قرارگرفته است، اما ارزیابی آن‌ها به‌لحاظ کیفی با توجه به توضیحات فوق کمتر انجام‌شده است. به‌عنوان نمونه در کشور هندوستان شروع این کار به سال ۱۹۷۲ برمی‌گردد (Husen *et al*, 2007). در ایران نیز به‌منظور ساماندهی مواد کودی و ارتقاء کیفیت آن‌ها، با استفاده از ظرفیت‌های قانونی موجود" آیین نامه ثبت و کنترل کیفی انواع مواد کودی" در تاریخ ۹۳/۸/۲۱ توسط وزیر محترم جهاد کشاورزی ابلاغ گردید و موسسه خاک و آب متولی انجام این امر قرار داده شد.

خاطر نشان می‌شود که بهره‌گیری از کودهای زیستی در کشاورزی و مشاهده اثرات مثبت آن‌ها منوط به رعایت

1-Plant growth-promoting rhizobacteria
2-Kloepper & Schroth

جنبه‌های کیفی این کودها و استفاده از سویه‌های مؤثر با توجه به ویژگی PGPR آن‌هاست (Deaker *et al*., 2011). کنترل کیفیت کودهای زیستی فرایندی چند مرحله‌ای بوده و مجموعه‌ای از آزمایشات نظیر آزمون‌های آزمایشگاهی تا گلدانی و مزرعه‌ای را شامل می‌شود (Husen *et al*., 2007). برای تائید حضور گونه‌های کارا و همچنین حضور جمعیت فعال میکروبی در مدت زمان اعتبار کود زیستی، انجام کنترل کیفیت لازم می‌باشد. کنترل کیفیت کود زیستی عبارت است از سنجش کیفیت و توان کودهای زیستی به‌لحاظ برخی ویژگی‌ها از قبیل شمار جمعیت میکروبی، توانایی تثبیت نیتروژن، توان انحلال فسفات نامحلول، توان تولید اکسین، قدرت رهاسازی پتاسیم و همچنین تشخیص عدم وجود آلودگی و تایید گونه‌های میکروبی به‌کار رفته در کود زیستی با استفاده از تکنیک‌های خاص (Husen *et al*., 2007). در مطالعه‌ای که بین سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ روی کودهای زیستی رایج در کشور اندونزی انجام گرفت، ۴۱ کود زیستی مورد مطالعه قرار گرفت. در اغلب این کودها از دو یا تعداد بیشتری ریزجاندار استفاده شده بود. نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های حل‌کنندگی فسفات و تولید اکسین توسط این نوع از کودها حاکی از این بود که تنها یک نوع کود زیستی قادر به سنتز اکسین توسط باکتری *آزوسپیریلوم لیپوفروم* در محیط نمک‌های معدنی حداقل (حاوی ال- تریپتوفان) بود. در این مطالعه کیفیت کودهای بیولوژیک در آزمایشگاه بر اساس تراکم و فنوتیپ میکروبی و صفات کاربردی (PGP) مورد آزمایش قرار گرفت. به‌طور کلی هر کود شامل دو یا چند سویه میکروبی و با عملکرد چندگانه ادعا شده بود. با این حال، بسیاری از آن‌ها (بیش از ۹۰ درصد) فاقد برچسب اطلاعات تاریخ انقضا بودند. این‌ها حاکی از نیاز فوری برای بهبود سیستم استاندارد کیفیت کودهای بیولوژیک موجود می‌باشد (Husen *et al*., 2007).

یکی از جنبه‌های مهم کنترل کیفیت، صحت جنس و گونه به‌کارگیری شده و ویژگی محرک رشدی آن اعم از انحلال فسفات، تولید اکسین و غیره می‌باشد. لذا در پژوهش حاضر، به بررسی ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه توسط سویه‌های مورد ادعا در چهار نوع کود زیستی رایج ایران پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی جدایه‌ها و شناسایی مولکولی

در این پژوهش چهار نوع کود زیستی رایج در کشور شامل نیتروکسین، سوپرنیتروپلاس، بیوسوپرفسفات (تولیدی شرکت فناوری زیستی مهر آسیا، هر سه محصول به‌صورت مایع) و بارور۲ (تولیدشده در شرکت زیست فناور سبز، به‌صورت جامد) انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش در سالهای ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ در دانشگاه تبریز انجام گرفت.

به‌منظور جداسازی جدایه‌های باکتریایی مورداستفاده در کودهای زیستی، ابتدا سری‌های رقت تهیه شد و از چهار رقت پایانی (رقت $۱۰^{-۹}$، $۱۰^{-۸}$، $۱۰^{-۷}$ و $۱۰^{-۶}$) در ۲ تکرار به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط جامد عمومی و اختصاصی انتقال داده شد، برای این منظور از محیط غیرانتخابی NA[3] و سه محیط انتخابی Sperber، N-free medium و N-free bromothymol blue استفاده شد که به‌ترتیب برای رشد عموم باکتری‌ها، باکتری‌های حل‌کننده فسفات و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن از نوع *Azotobacter* و *Azospirillum* قابل‌استفاده می‌باشد (Motsara & Roy, 2008). بعد از گسترده نمودن سوسپانسیون میکروبی از رقت‌های موردنظر در محیط کشت جامد عمومی و اختصاصی، بر اساس فنوتیپ و ریخت کلنی باکتری‌ها اقدام به جداسازی باکتری‌ها شد تا تست‌های تأییدی مبنی بر وجود ایزوله‌های مورد انتظار روی آن‌ها انجام گیرد. بهره‌گیری از محیط کشت‌های انتخابی برای ایزوله‌های خاص و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی ساده و رنگ‌آمیزی گرم (Deaker *et al*., 2011) و شناسایی مولکولی برای تائید حضور جنس‌های مورد ادعا انجام گرفت. در نهایت دو جدایه از بارور۲ (Ba1 و Ba2)، چهار جدایه از بیوسوپرفسفات (Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4)، دو جدایه از سوپرنیتروپلاس (Sn1 و Sn2) و پنج جدایه از نیتروکسین (N1، N2، N3، N4 و N5) جداسازی شد. برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها به روش 16S rRNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R خریداری شده از شرکت ژن فناوران استفاده شد. هر چند هدف این مقاله بررسی ویژگی‌های محرک رشدی گیاه نظیر انحلال فسفات، تولید اکسین، سایدروفور، رهاسازی پتاسیم برای جدایه‌های به‌دست آمده از این کودها بوده

3-Nutrient Agar

است اما نتایج شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی این جدایه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. نیاز به یادآوری است که ۱۳ جدایه به‌دست آمده از کودهای زیستی به عنوان تیمارهای آزمایشی با در نظر گرفتن سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط درون شیشه‌ای آزمون شدند. مقایسه میانگین‌ها در بین جدایه‌های مختلف توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام‌شده است.

جدول ۱- آغازگرهای عمومی برای تکثیر بخش 16S rDNA باکتری‌ها

Table 1: General primers for amplification of bacterial 16S rDNA.

نام آغازگر Name of the primer	توالی آغازگر Sequence of primer	دمای پیوند Annealing temperature
27F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	Tm:53
1492R	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'	

جدول۲- نتایج شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی جدایه‌های مورد استفاده در کودهای زیستی و ادعای سازندگان

Table 2: Results of the molecular and biochemical identification of the isolates used in biofertilizer

نتیجه شناسایی Result of the identification	جدایه Isolates	جنس و گونه باکتری مورد ادعا Genus and species of the bacteria claimed	کود زیستی Biofertilizer
Pseudomonas aeruginosa	N1	Azospirillum sp. Azotobacter sp.	نیتروکسین Nitroxin
Pseudomonas fluorescens	N2		
Citrobacter freundii	N3		
Pseudomonas sp.	N4		
Pseudomonas aeruginosa	N5		
Bacillus firmus	Sn1	B. subtilis, Pseudomonas sp. Azospirillum sp.	سوپرنیتروپلاس Supernitroplus
Pseudomonas aeruginosa	Sn2		
Pseudomonas sp.	Bio1	Bacillus sp. Pseudomonas sp.	بیوسوپرفسفات Biosuperphosphate
Acinetobacter johnsonii	Bio2		
Pseudomonas aeruginosa	Bio3		
Bacillus firmus	Bio4		
Pantoea agglomerans	Ba1	Pantoea agglomerans P. putida	بارور۲ Barvar2
Pseudomonas sp.	Ba2		

اندازه‌گیری ویژگی‌های محرک رشدی گیاه جدایه‌های باکتریایی کودهای زیستی

آزمون کیفی حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات): برای انجام این آزمون از محیط کشت اسپربر (Sperber, 1958) استفاده شد که در این محیط تری‌کلسیم فسفات به‌عنوان تنها منبع فسفر بود. برای هر سویه باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته و سطح هر پتری به سه قسمت مساوی تقسیم شد، مرکز هر قسمت با ۵ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری تلقیح و ظروف پتری تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تمامی پلیت‌ها در سه نوبت ۳، ۷ و ۱۲ روز پس از تلقیح از انکوباتور خارج شده و قطر کلنی رشد یافته (Colony Diameter) و نیز قطر هاله شفاف (شامل قطر کلنی و بخش شفاف اطراف آن) حاصل از انحلال فسفات (HD) به دقت اندازه‌گیری شد، متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) در روز هفتم برای هر جدایه محاسبه گردید. لازم به‌ذکر است که جهت مقایسه هم‌زمان تمام سویه‌ها از نظر تمام ویژگی‌های PGP ابتدا کشت شبانه آن‌ها در محیط عمومی نظیر NB تهیه

شده و پس از قرائت OD و یکسان‌سازی جمعیت باکتری تلقیح آن‌ها انجام گرفت.

آزمون کمی حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات): در این مرحله برای بررسی دقیق‌تر میزان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های باکتریایی، هر جدایه باکتری با سه تکرار در محیط کشت اسپربر مایع کشت شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر اسپربر مایع افزوده شد. ارلن‌های حاوی محیط مایع تلقیح شده و نمونه شاهد در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند.

از سوسپانسیون‌های حاصل مقدار ۲ میلی‌لیتر برداشته و پس از ۵ بار رقیق‌سازی با آب مقطر در دور ۵۰۰۰ و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله سلول‌ها، ذرات باکتری و فسفات نامحلول از سوسپانسیون جمع‌آوری و مقدار فسفر محلول در مایع صاف رویی به روش وانادات-مولیبدات اندازه‌گیری شد (Jeon *et al.*, 2003). بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، میزان جذب نور با استفاده اسپکتروفتومتر در ۴۳۰ نانومتر قرائت شد و مقدار فسفر آزاد شده توسط هر جدایه براساس میزان جذب نور مربوط به آن با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از KH_2PO_4 محاسبه گردید (Deaker *et al.*, 2011).

آزمون کمی معدنی شدن فسفات آلی: در این مرحله برای بررسی میزان معدنی شدن فسفات آلی توسط جدایه‌های باکتریایی، هر جدایه باکتری با سه تکرار در محیط کشت اسپربر مایع حاوی اینوزیتول هگزا فسفریک اسید کشت شد، این سوبسترا قبل از استفاده به کمک هیدروکسید سدیم بر روی pH ۷ تنظیم شد و به‌صورت فیلتر استریل در محیط مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر اسپربر مایع افزوده شد. ارلن‌های حاوی محیط مایع تلقیح شده و نمونه شاهد در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند. از سوسپانسیون‌های حاصل مقدار ۲ میلی‌لیتر برداشته و پس از ۵ بار رقیق‌سازی با آب مقطر (حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر) در دور ۵۰۰۰ و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سایر مراحل مطابق روش فوق بود.

آزمون کمی توان تولید اکسین: توان تولید ایندول استیک اسید (IAA) جدایه‌های باکتریایی موجود در کودهای زیستی، پس از آزمون در چندین محیط (GP[4]، NB[5]، M9[6]، LB[7] و BKH[8]) در نهایت با استفاده از محیط LB به‌عنوان مناسب‌ترین محیط انجام گرفت (مطابق جدول ۳). محیط‌های کشت با و بدون پیش ماده تریپتوفان مورد سنجش قرار گرفتند. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر L-تریپتوفان و محیط فاقد تریپتوفان منتقل شد و بعد از ۷۲ ساعت، سوسپانسیون باکتری در دور ۵۰۰۰ و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول صاف رویی با ۴ میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (از اختلاط یک میلی‌لیتر از محلول ($FeCl_3$) ۰/۵ مولار با ۵۰ میلی لیتر پرکلریک اسید ۳۵ درصد) مخلوط شد (Suzuki *et al.*, 2003). این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید و مقدار تولید IAA توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد تهیه شده در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و۲۰ میلی‌گرم در لیتر IAA محاسبه شد (Deaker *et al.*, 2011). آزمایش با لحاظ کردن فاکتور تریپتوفان به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

آزمون کیفی تولید سایدروفور: این آزمون با استفاده از محیط CAS.B.A[9] انجام پذیرفت (Pére *et al.*, 2007). پلیت‌های حاوی محیط CAS-آگار پس از انجماد، به سه قسمت مساوی تقسیم شده و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه هر جدایه در وسط هر قسمت با روش قطره‌گذاری با سه تکرار تلقیح گردید. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۸

4- Glucose peptone Medium
5- Nutrient Broth
6- M9 Minimal Medium
7 - Luria-Bertani medium
8 - BKH Minimal Medium
9 - CAS Blue Agar

درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. توانایی تولید سایدروفور از روی تغییر رنگ بسیار مشخص محیط CAS-آگار از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری‌ها، ارزیابی شد. همچنین قطر کلنی باکتری و نسبت قطر هاله به قطر کلنی نیز تعیین گردید.

آزمون کمی تولید سایدروفور: بدین منظور ۵ میلی‌لیتر از محلول معرف CAS به داخل لوله‌های آزمایش ریخته و سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی کشت باکتری به آن افزوده شد و پس از گذشت یک ساعت میزان جذب در طول موج ۶۹۸ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. به‌منظور کمی‌سازی میزان سایدروفور تولیدی توسط باکتری‌ها از کلات‌کننده DTPA[10] استفاده شد، لذا غلظت ترکیبات کلات‌کننده میکروبی یا سایدروفور تولیدی با استفاده از نمودار استاندارد (تغییر رنگ محلول CAS در حضور غلظت‌های مختلف DTPA)، بر حسب معادل DTPA در نظر گرفته خواهد شد (Neilands, 1995). پس از تهیه غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میکرو مول بر لیتر کلات‌کننده DTPA، یک میلی‌لیتر از آنها به ۵ میلی‌لیتر از محلول CAS اضافه می‌شود و پس از یک ساعت میزان جذب در طول موج ۶۹۸nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری می‌شود (Aliasgharzad *et al*, 2009).

آزمون کمی میزان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا: برای انجام این آزمون در محیط مایع، ابتدا کشت شبانه باکتری‌ها در محیط NB انجام پذیرفت و به‌مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از این کشت برای تلقیح در ۲۵ میلی‌لیتر محیط الکساندروف مایع حاوی کانی میکای سفید (موسکویت) یا سیاه (بیوتیت) استفاده شد. برای نمونه شاهد بدون تلقیح باکتری نیز ۵۰۰ میکرولیتر محیط NB استریل افزوده شد. پس از تلقیح میکروبی تحت شرایط فوق‌الذکر، انکوباسیون به‌مدت ۱ هفته در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد با شرایط شیک ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون اجزای محیط در شرایط سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه، رسوب داده شد و از بخش محلول رویی برای تعیین میزان پتاسیم آزاد شده استفاده شد (Sarikhani *et al*, 2013).

جدول ۳- اجزای محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون‌ها

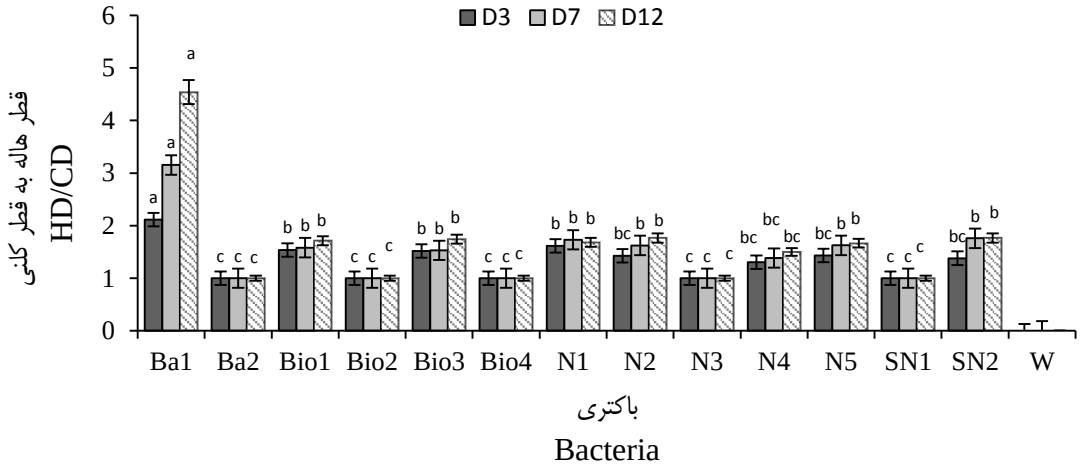
Table 3: Components of the mediums used in tests.

محیط کشت Medium	اجزای محیط کشت (g/l) components of the medium
LB	Peptone 10; NaCl 10; Yeast Extract 5
NB	Peptone 5; NaCl 5; Yeast Extract 1.5; Meat extract 1.5
M9	Glucose 20% (10ml); Na2HPO4 12; KH2PO4 3; NaCl 0.5; NH4Cl 1; MgSO4 1M (2ml); CaCl2 1M (0.1ml)
GP	Glucose 5; Peptone 10
BKH	K2HPO4 0.4; KH2PO4 0.1; MgSO4.7H2O 0.2; (NH4)2SO4 1.5; NaCl 0.1; CaCl2 0.1; Malic Acid 2.5; Yeast Extract 0.5.
Sperber	Glucose 10; Yeast extract 0.5; CaCl2 0.1; MgSO4.7H2O 0.25; Ca3(PO4)2 2.5; Agar 15.
Aleksandrov	Glucose 5; Ca3(PO4)2 2; MgSO4.7H2O 0.5; FeCl3 0.005; CaCO3 0.1; Mica 2

10 - Diethylenetriamine pentaacetate

نتایج و بحث

آزمون کیفی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات): اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) مشخص کرد که اکثر جدایه‌های مورد مطالعه قادر به انحلال فسفات نامحلول هستند، به‌طوریکه از ۱۳ جدایه مورد بررسی ۸ جدایه توانستند در محیط جامد اسپربر تشکیل هاله نمایند. از این رو توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی را می‌توان به عنوان یکی از پتانسیل‌های مهم تحریک رشد گیاه توسط باکترهای PGPR در نظر گرفت. توانایی انحلال فسفات نامحلول معدنی در شرایط درون شیشه در تعداد زیادی از ریزجانداران مشاهده شده است (Whitelaw *et al*., 1999). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین توانایی جدایه‌های مختلف در انحلال فسفات معدنی اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت ($P<0/01$). از سوی دیگر تأثیر هر یک از جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های نامحلول در زمان‌های مختلف نیز در سطح یک درصد معنی‌دار بود. در تعدادی از جدایه‌ها نسبت قطر هاله به قطر کلنی با گذشت زمان افزایش یافت اما در تعدادی دیگر تغییرات آن دارای روند خاصی نبود. در این آزمون میزان توانایی و شاخص انحلال فسفات در جدایه‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بود. جدایه‌های Ba1، N1، SN2 و Bio1 به‌ترتیب بیشترین توانایی انحلال فسفات معدنی را داشتند. بیشترین نسبت بعد از گذشت هفت روز مربوط به جدایه Ba1 (۳/۲) و کمترین مقدار مربوط به جدایه‌های N3، Bio2، Bio4، SN1 و Ba2 بود که نتایجی مشابه شاهد (۱۰ میکرولیتر محیط استریل NB به‌صورت نقطه افزوده شده بود) نشان دادند یعنی قادر به انحلال فسفات معدنی نبودند (شکل ۱).

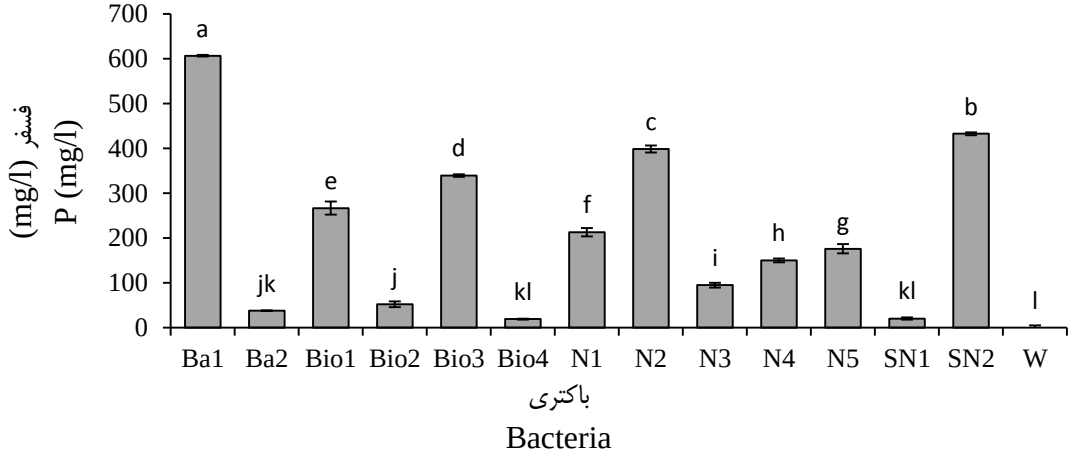


شکل ۱- مقایسه نسبت قطر هاله به قطر کلنی ۱۳ جدایه در ارزیابی کیفی انحلال فسفات معدنی. Ba1 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس، N1، N2، N3، N4 و N5 از نیتروکسین و W شاهد. D3، D7 و D12 به‌ترتیب نمایانگر اندازه‌گیری در روزهای سوم، هفتم و دوازدهم از شروع آزمایش می‌باشد

Fig.1. Comparison of the ratio of hallo diameter to the colony diameter (HD/CD) of 13 isolates in quality assessment of inorganic phosphate dissolution. Ba1 and Ba2 from Barvar2, Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4 from Biosuperphosphate, SN1 and SN2 from Supernitroplus, N1, N2, N3, N4 and N5 from Nitroxin and W is control. D3, D7 and D12 represents the incubation day respectively 3, 7 and 12 days

آزمون کمی قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین جدایه‌ها از لحاظ قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد. جدایه‌های Ba1، SN2 و N2 بیشترین میزان حل‌کنندگی فسفر به‌ترتیب با مقادیری برابر با ۶۰۶/۴، ۴۳۲/۴ و ۳۹۸/۵ میلی‌گرم بر لیتر فسفر و کمترین میزان حل‌کنندگی در جدایه‌های SN1 و Bio4 (۲۰/۵۶ و ۱۹/۴ میلی‌گرم بر لیتر) به‌دست آمد (مطابق با شکل ۲). با وجود آنکه تفاوت چندانی در قطر هاله به کلنی در جدایه‌های

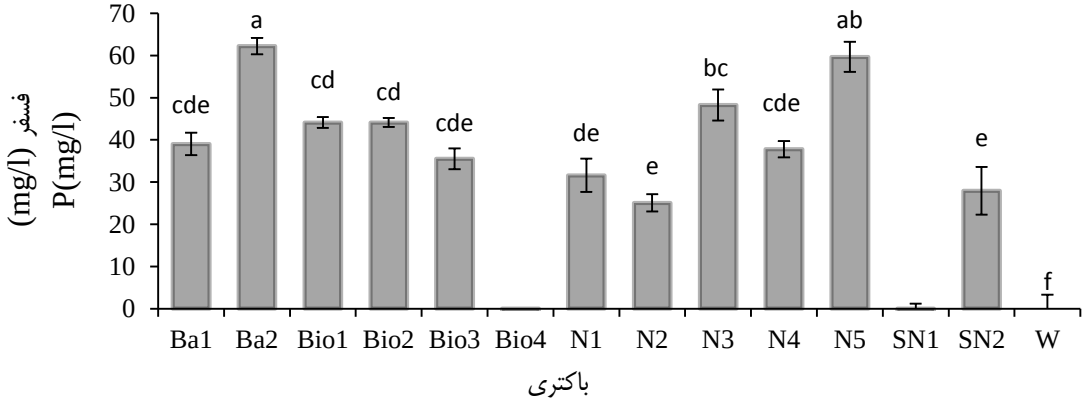
SN2 و N2 با بقیه وجود نداشت ولی آزادسازی فسفر در محیط مایع آن‌ها با بسیاری از جدایه‌ها قابل‌توجه بود، علت این امر می‌تواند به‌تفاوت شرایط انجام آزمایش در دو حالت جامد و مایع باشد به‌طوریکه در حالت جامد مقدار کمتری از سوبسترا در اختیار باکتری قرار می‌گیرد در حالی‌که در حالت مایع به‌دلیل وجود تکان‌های شیکر دسترسی سوبسترا برای باکتری کاملا فراهم شده و می‌تواند مقدار بیشتری از تری کلسیم فسفات را حل کند. به‌علاوه گرچه در برخی از موارد بین هاله شفاف و انحلال فسفات در محیط مایع همبستگی مشاهده شده است اما در پژوهش‌های دیگر چنین رابطه‌ای به‌دست نیامده است (Rodriguez *et al.*, 2006).



شکل ۲- میزان انحلال فسفات معدنی جدایه‌ها در روش ارزیابی کمی. Ba1 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس ، N1، N2، N3 ، N4 و N5 از نیتروکسین و W شاهد

Fig. 2- Amount of dissolution inorganic phosphate isolates in the method of quantitative evaluation. Ba1 and Ba2 from Barvar2, Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4 of Biosuperphosphate, SN1 and SN2 of Supernitroplus, N1, N2, N3, N4 and N5 of Nitroxin and W is control

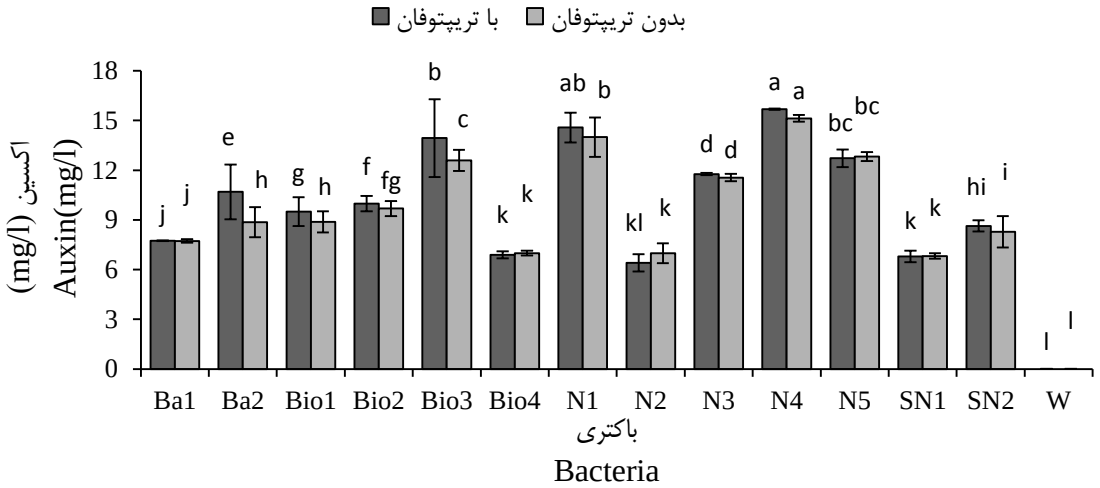
آزمون کمی قدرت معدنی کردن فسفات آلی (اینوزیتول هگزافسفریک اسید): تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین جدایه‌ها از لحاظ قدرت معدنی ساختن فسفات آلی (اینوزیتول هگزا فسفریک اسید) در محیط اسپربر مایع تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد. جدایه‌های Ba2، N5 و N3 بیشترین توان و به‌ترتیب با مقادیری برابر با ۶۲/۲، ۵۹/۶ و ۴۸/۲ میلی‌گرم بر لیتر فسفر و جدایه‌های SN1 و Bio4 کمترین توان معدنی ساختن فسفات آلی را داشتند (شکل ۳).



شکل ۳- توان جدایه‌ها در معدنی کردن فسفات آلی به روش کمی. Ba1 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس ، N1، N2، N3 ، N4 و N5 از نیتروکسین وW شاهد

Fig.3. Mineralization of organic phosphate in the quantitative method by isolates. Ba1 and Ba2 from Barvar2, Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4 of Biosuperphosphate, SN1 and SN2 of Supernitroplus, N1, N2, N3, N4 and N5 of Nitroxin and W is control

مقایسه جدایه‌ها از نظر تولید اکسین: نتایج تجزیه واریانس اثر جدایه‌ها بر تولید اکسین نیز نشان می‌دهد که بین جدایه‌ها از نظر مقدار تولید هورمون اکسین (IAA) تفاوت کاملاً معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد. نتایج حاصل از ارزیابی کمی توان تولید هورمون اکسین در ۱۳ جدایه نشان داد که همه باکتری‌های مورد مطالعه قادر به تولید هورمون اکسین بودند. در این آزمون از محیط کشت LB با و بدون ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ال– تریپتوفان به‌عنوان پیش‌ماده سنتز اکسین استفاده شد. به‌نظر می‌رسد توانایی تولید هورمون اکسین (IAA) به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین شاخص‌های محرک رشد گیاهی، در بخش عمده‌ای از جدایه‌های مورد نظر قابل مشاهده است. بیشترین مقدار تولید هورمون اکسین توسط جدایه‌های N4، N1 و Bio3 به‌ترتیب معادل ۱۵/۶، ۱۴/۵ و ۱۳/۹ میلی‌گرم در لیتر و کمترین مقدار آن توسط جدایه N2 و معادل ۶/۴ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (شکل ۴). تولید اکسین در جدایه‌های به‌کار رفته در کودهای زیستی گرچه تحت تاثیر تریپتوفان روند افزایشی نشان داده اما به‌نظر تولید اکسین وابسته به تریپتوفان افزوده شده نمی‌باشد چرا که اختلاف معنی‌داری در حضور و عدم حضور آن دیده نشد. قابل ذکر است که محیط ارزیابی تولید اکسین محیط کشت LB بوده است که به‌دلیل استفاده از عصاره مخمر در آن، اسیدآمینه پیش‌ساز اکسین وجود خواهد داشت. در غالب مطالعات پایش تولید اکسین معمولاً از محیط کشت‌های معدنی تعریف شده فاقد تریپتوفان استفاده می‌شود. اکسین به‌عنوان یک هورمون، در سلول‌های باکتری عملی را انجام نمی‌دهد بلکه باکتری‌ها تنها با تولید این هورمون و افزایش رشد گیاه و به‌دنبال آن افزایش ترشحات ریشه‌ای و متابولیت‌های گیاهی شرایط بهتری را برای رشد خود فراهم می‌کنند (Glick *et al.*, 1998). بنابراین به نظر می‌رسد که وقتی باکتری‌ها در محیط‌های رشد حداقل یا در برخورد با تنش‌های سخت زیستی قرار می‌گیرند برای اینکه شرایط بهتری را برای رشد خود ایجاد نمایند تریپتوفان بیشتری را به اکسین تبدیل می‌کنند. از این رو، این احتمال وجود دارد که در شرایط سخت مانند تنش رطوبت، تولید اکسین در مقایسه با شرایط درون شیشه افزایش یابد.



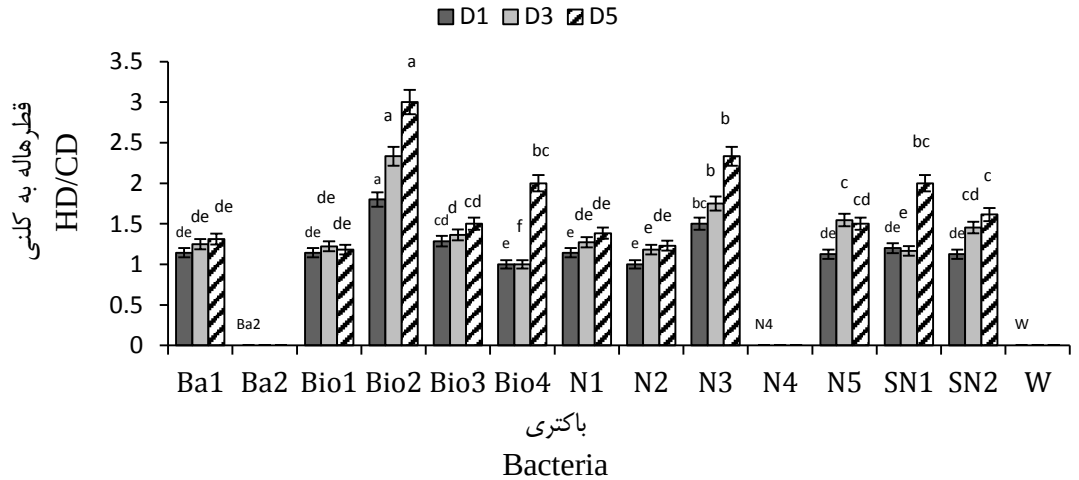
شکل ۴- تولید اکسین (IAA) توسط جدایه‌ها. Ba1 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس ، N1، N2، N3 ، N4 و N5 از نیتروکسین و W شاهد

Fig.4. Production of Auxin (IAA) by these isolates. Ba1 and Ba2 from Barvar2, Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4 of Biosuperphosphate, SN1 and SN2 of Supernitroplus , N1, N2, N3, N4 and N5 of Nitroxin and W is control

تولید اکسین (IAA) توسط باکتری‌های ریزوسفری به دفعات توسط پژوهندگان گزارش شده است. میزان تولید هورمون اکسین (IAA) توسط جدایه‌های مورد آزمون در حضور مقدار مشخصی از ال– تریپتوفان (50 ppm) و نیز عدم حضور آن، با یکدیگر متفاوت بود. از این رو به‌نظر می‌رسد که جدایه‌های مورد آزمون دارای تنوع ژنتیکی و در نتیجه پتانسیل‌های متفاوتی از نظر توان تولید هورمون اکسین در شرایط مشابه هستند. با نگاهی به نتایج به‌دست آمده در شکل چهار پی‌می‌بریم که افزودن ال-تریپتوفان به محیط رشد باکتری‌ها، کم و بیش باعث تولید بیشتر اکسین شده است و این موضوع در باکتری‌های Bio3 و به‌ویژه Ba2 کاملاً به چشم می‌خورد. بنزری و همکاران

(Benizri *et al*, 1998) توان تولید اکسین در یک سویه از باکتری *سودوموناس پوتیدا* با افزایش غلظت تریپتوفان در محیط کشت افزایش معنی‌داری یافت (Bent *et al*., 2001). بریک و همکاران (Bric *et al*., 1991) با مطالعه تولید اکسین توسط ۵۳ جدایه که مربوط به جنس‌های مختلف بودند به این نتیجه رسیدند که این جدایه‌ها می‌توانند به‌میزان ۱/۳ تا ۷ میلی‌گرم در لیتر اکسین تولید نمایند. در بررسی دیگر که بر روی اثرات محرک رشدی سویه‌های بومی ازتوباکتر کروکوکوم بر رشد، عملکرد و جذب عناصر غذایی گیاه گندم در خاک‌های استان چهارمحال بختیاری انجام گرفت، مشخص شد که از بین ۷۰ سویه جداسازی شده ازتوباکتر در ۷۵ خاک ریزوسفری تنها سه سویه AZT-13، AZT-72 و AZT-25 قادر به تولید اکسین در غلظت‌های ۷۰، ۶۷ و ۷۲ میلی‌گرم در لیتر بودند تولید بیشتر IAA در یک جدایه نسبت به جدایه دیگر احتمالاً به‌دلیل استفاده بهتر از ترکیبات محیط توسط آن جدایه می‌باشد (Rajai *et al*., 2007).

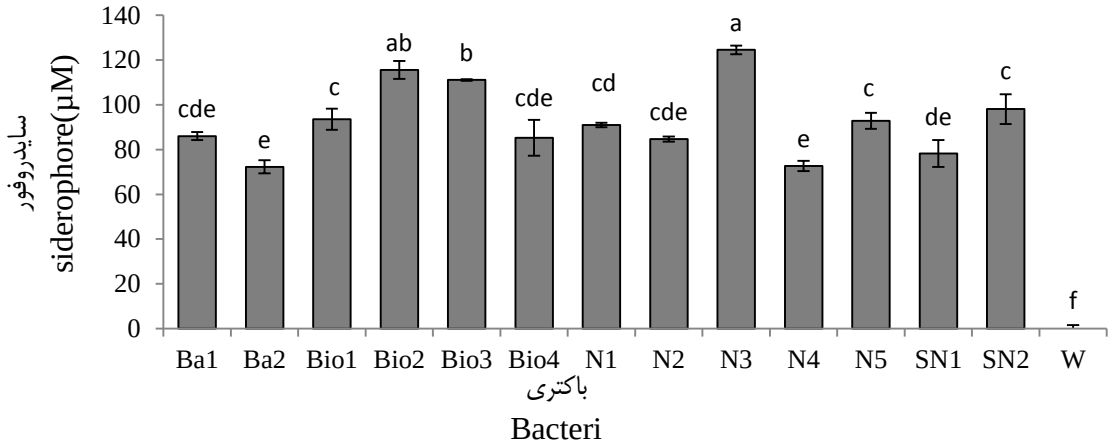
آزمون کیفی توان تولید سایدروفور: آزمون کیفی توان تولید سایدروفور از طریق مشاهده هاله نارنجی اطراف کلنی و اندازه‌گیری نسبت قطر هاله به کلنی در محیط CAS آگار در روزهای اول، سوم و پنجم پس از تلقیح مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای باکتریایی، زمان و اثر متقابل آنها بر تولید سایدروفور در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. با گذشت زمان میزان تولید سایدروفور به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین نسبت بر مبنای روز سوم (به‌عنوان میانگین تقریبی) در جدایه Bio2 و N3 به‌دست آمد، باکتری‌های Ba2 و N4 قادر به تولید سایدروفور نبودند (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه تولید سایدروفور به روش کیفی توسط جدایه‌ها. D11 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس، N1، N2، N3، N4 و N5 از نیتروکسین و W شاهد. D3 و D5 به ترتیب نمایانگر اندازه گیری در روزهای اول، سوم و پنجم از شروع آزمایش می‌باشد

Fig.5. Comparison of the siderophore production by isolates in Qualitative method. Ba1 and Ba2 from Barvar2, Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4 from Biosuperphosphate, SN1 and SN2 from Supernitroplus, N1, N2, N3, N4 and N5 from Nitroxin and W is control. D3, D7 and D12 represents the incubation day respectively 3, 7 and 12 days

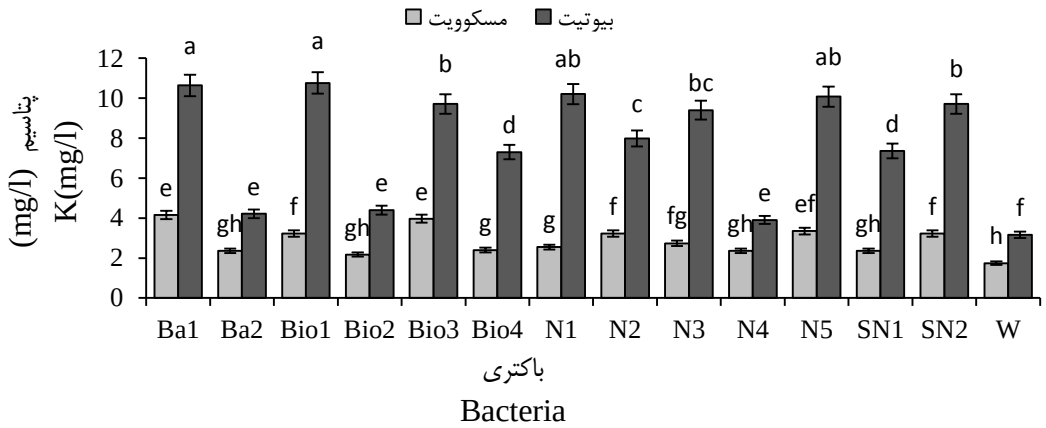
آزمون کمی توان تولید سایدروفور: نتایج در برآورد سایدروفور به روش کمی شکل ۶ تقریباً همبستگی خوبی با روش کیفی نشان داد به‌صورتی که بیشترین میزان آن در جدایه‌های N3 و Bio2 به‌دست آمد اما در مورد دو جدایه Ba2 و N4 علی‌رغم اینکه در روش کیفی شاهد تولید سایدروفوری نبودیم اما در روش کمی مقادیر نزدیک به ۷۲ میکرومولار برای آن‌ها به‌دست آمد که دلیل این تفاوت را بایستی در دقت این دو روش سنجش جستجو نمود (Khoshrou *et al*., 2014).



شکل ۶- مقادیر سایدروفور تولیدی به روش کمی توسط جدایه‌ها. Ba1 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس، N1، N2، N3 ، N4 و N5 از نیتروکسین و W شاهد

Fig.6. Values of siderophore production by isolates in quantitative method. Ba1 and Ba2 from Barvar2, Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4 of Biosuperphosphate, SN1 and SN2 of Supernitroplus , N1, N2, N3, N4 and N5 of Nitroxin and W is control

آزمون کمی میزان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قدرت رهاکنندگی پتاسیم از کانی‌های مسکویت و بیوتیت نشان داد که سویه‌های فوق دارای اثر معنی‌دار بر رهاسازی پتاسیم هستند. طبق انتظار جدایه‌ها توانستند پتاسیم بیشتری از بیوتیت در مقایسه با مسکویت خارج کنند. در میکای سیاه (بیوتیت) جدایه‌های Bio1 و Ba1 به‌ترتیب با ۱۰/۷۶ و ۱۰/۶۳ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین توان را در آزادکنندگی پتاسیم نشان دادند و در میکای سفید (مسکویت) جدایه‌های Ba1 و Bio3 به‌ترتیب با ۴/۸۷ و ۳/۹۶ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین توان را در آزادکنندگی پتاسیم نشان داداند (شکل ۷). با توجه به این که بیش از ۹۸ درصد پتاسیم موجود در خاک به‌شکل کانی‌های اولیه و کانی‌های سیلیکاته (میکروکلین، موسکویت، ارتوکلاز، بیوتیت، فلدسپار، میکا، ایلایت و غیره) می‌باشد (Sugumaran & Janarthanam, 2007) تاکید بر شناسایی و جداسازی باکتری‌های با توان آزادسازی پتاسیم می‌تواند در مطالعات پیش‌رو مورد توجه قرار گیرد. باکتری *B. mucilaginosus* سال‌های زیادی است که به‌عنوان کود زیستی پتاسیم در برخی از کشورها از جمله چین مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jeon *et al.*, 2003). لیو و همکاران (Liu *et al*, 2006) در آزمایشی به بررسی میزان انحلال کانی‌های میکروکلین، موسکویت و اورتوکلاز در حضور باکتری *B. mucilaginosus MCRCp1* پرداختند و بیشترین میزان رهاسازی پتاسیم به مقدار ۴/۲۹ میلی‌گرم در لیتر با کانی میکای موسکویت مشاهده کردند.



شکل ۷- مقادیر آزادسازی پتاسیم از کانی میکا توسط جدایه‌ها. Ba1 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس ، N1، N2، N3 ، N4 و N5 از نیتروکسین و W شاهد

Fig.7. Values of potassium release from the Mica by isolates. Ba1 and Ba2 from Barvar2, Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4 of Biosuperphosphate, SN1 and SN2 of Supernitroplus, N1, N2, N3, N4 and N5 of Nitroxin and W is control

نتیجه‌گیری کلی

کودهای زیستی یکی از مهم‌ترین اجزاء کشاورزی آلی و پایدار محسوب می‌شوند. اطمینان از اثربخشی هر محصول، اولین حق هر مصرف‌کننده است که می‌بایستی از طریق سازمان‌ها و یا وزارتخانه‌های ذیربط تضمین گردد. باید به‌خاطر داشت که تداوم استقبال کشاورزان از کودهای مذکور بستگی به‌کیفیت آن‌ها دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که از نظر ویژگی انحلال فسفات معدنی و معدنی ساختن فسفات آلی می‌توان به‌ترتیب به جدایه‌های Ba1 و Ba2 اشاره نمود و نیز این باکتری‌ها در آزادسازی پتاسیم از کانی های میکا هم خوب عمل کردند. این جدایه‌ها در کود زیستی بارور۲ مورد استفاده قرار می‌گیرند و به‌عنوان کود زیستی فسفاته در کشور عرضه می‌شود. همچنین جدایه N4 به‌دست آمده از کود نیتروکسین، جدایه برتر در تولید اکسین بوده و بیشترین سایدروفور تولیدی به جدایه N3 و Bio2 اختصاص داشت که به‌ترتیب در کود زیستی نیتروکسین و بیوسوپرفسفات استفاده می‌شوند.

لازم به توضیح است که کود بارور۲ و بیوسوپرفسفات بیشتر به‌عنوان کودهای زیستی فسفاته شناخته می‌شوند و مورد مصرف قرار می‌گیرند و کودهای نیتروکسین و سوپرنیتروپلاس بیشتر به‌عنوان کودهای زیستی نیتروژنه مورد توجه هستند، اما عدم وجود *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم* به‌عنوان باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن در این کودها، دیگر جایی برای آزمون تثبیت نیتروژن باقی نگذاشت، هر چند بر ویژگی‌های انحلال فسفات یا تولید اکسین آن‌ها نیز تاکید می‌شود. با در نظر گرفتن صفات و ویژگی‌های مختلف مورد توجه این تحقیق، به‌نظر جدایه‌های موجود در کود سوپرنیتروپلاس در وضعیت ضعیفتری نسبت به کودهای دیگر قرار دارند. باتوجه به اینکه نخستین گام در بهره گرفتن از کودهای زیستی وجود سویه‌های کارآمد و برتر در آن‌ها می‌باشد، لذا صرف نظر از ویژگی‌های PGPR ای، تنها کودی که در بین کودهای مورد آزمایش از نظر صحت گونه‌های باکتریایی به‌کار رفته مورد قبول و مطابق با ادعای شرکت سازنده بود کود زیستی بارور۲ (محصول شرکت زیست فناور سبز) بود.

References

Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied microbiology and biotechnology, 85(1), 1-12.

Aliasgharzad, N., Shirmohamadi, E., & Oustan, S. (2009). Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. Soil Environ, 28(2), 119-123.

Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2010). Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium Azospirillum promotes plant growth—a critical assessment. Advances in agronomy, 108, 77-136.

Benizri, E., Courtade, A., Picard, C., & Guckert, A. (1998). Role of maize root exudates in the production of auxins by Pseudomonas fluorescens M. 3.1. Soil Biology and Biochemistry, 30(10), 1481-1484.

Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C. P., & Enebak, S. (2001). Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 47(9), 793-800.

Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Applied and environmental Microbiology, 57(2), 535-538.

Deaker, R.,.László Kecskés, M., Timothy Rose, M., Amprayn, K., Krishnen, G., Thi Kim Cuc, T., Thuy Nga. V., Thi Cong, P., Thanh Hien, N., & Robert Kennedy, I. (2011). Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers.

Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. Journal of Theoretical Biology, 190(1), 63-68.

Suzuki, S., He, Y., & Oyaizu, H. (2003). Indole-3-acetic acid production in Pseudomonas fluorescens HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. Current microbiology, 47(2), 0138-0143.

Husen, E. H., Simanungkalit, R. D. M., & Saraswati, R. (2013). Characterization and quality assessment of Indonesian commercial biofertilizers. Indonesian Journal of Agricultural Science, 8(1).

Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., & Song, H. G. (2003). Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-, 41(4), 271-276.

Khoshru, B., Sarikani, M. R., & Ali Asgharzad, N. (2014). Investigation of the siderophores production potential by strains isolated from the biofertilizers (molecules for the Iron availability and control of the pathogens). National Congress of Soil and Environment, Urmia University, Urmia, Iran.

Leach, A. W., & Mumford, J. D. (2008). Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. Environmental pollution, 151(1), 139-147.

Liu, W., Xu, X., Wu X., Yang Q., Luo, Y., & Christie, P. (2006). Decomposition of silicate minerals by Bacillus mucilaginosus in liquid culture. Environmental Geochemistry and Health, 28: 133–140.

Motsara, M. R., & Roy, R. N. (2008). Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis (Vol. 19). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. Journal of Biological Chemistry, 270(45), 26723-26726.

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and soil, 287(1-2), 15-21.

Rajaee, S., Alikhani, H. A., & Raiesi, F. (2007). Effect of Plant Growth Promoting Potentials of< i> Azotobacter chroococcum</i> Native Strains on Growth, Yield and Uptake of Nutrients in Wheat. JWSS-Isfahan University of Technology, 11(41), 285-297.

Sarikhani M. R., Ebrahimi, M., Oustan, Sh., & Aliasgharzad, N. (2013). Application of Potassium Solubilizing Bacteria a Promising Approach in Sustainable Agriculture - Increasing of potassium releasing from k-containing minerals in presence of insoluble phosphate. The 1st International Conference on Environmental Crises and its Solutions, Islamic Azad University, Khozestan, Kish, Iran.

Sperber, J. I. (1958). Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Crop and Pasture Science, 9(6), 782-787.

Sugumaran, P., Janarthanam, B. (2007). Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agriculture Sciences, 3(3), 350-335.

Teaumroong, N., Wanapu, C., Chankum, Y., Arjharn. W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K., & Boonkerd, N. (2010). Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand. Microbes at Work, Springer, Berlin Heidelberg, pp: 293-312.

Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and soil, 255(2), 571-586.

Vikram, A., Alagawadi, A. R., Hamzehzarghani, H., & Krishnaraj, P. U. (2007). Factors related to the occurrence of phosphate solubilizing bacteria and their isolation in vertisols. Int. J. Agri. Res, 2(7), 571-580.

Whitelaw, M. A., Harden, T. J., & Helyar, K. R. (1999). Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus Penicillium radicum. Soil Biology and Biochemistry, 31(5), 655-665.

Assessment the important PGPR features of isolates used in biofertilizers Barvar2, Biosuperphosphate, Supernitroplus and Nitroxin

Bahman khoshrou[1], Mohammad Reza Sarikhani*[2], Nasser Aliasgharzad[3], Peyman Zare[4]

(Received: December 2014 Accepted: May 2015)

Abstract

Quality control of biofertilizers has several aspects that attention to properties of plant growth promoting of bacteria which used in biofertilizers as part of their quality control is taken into consideration. In this study, four kinds of biofertilizer commonly used in the Iran, including Nitroxin, Supernitroplus, Biosuperphosphate (industrial biotechnology company mehre Asia) and Barvar2 (produced in Greenbiotech Company) were selected and examined. Isolates used in Biofertilizers Ba1 and Ba2 from Barvar2, Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4 of Biosuperphosphate, SN1 and SN2 of Supernitroplus and N1, N2, N3, N4 and N5 of Nitroxin were evaluated for the solubilizing ability of organic and inorganic phosphates, auxin and siderophore production, and K release in both qualitative and quantitative methods. The results showed that the Ba1 strain with a maximum ratio of diameter of the clear zone to the colony (3.26 mm) and phosphate solubilizing (606.4 mg/l) in both qualitative and quantitative methods, had the maximum ability to dissolve insoluble inorganic phosphate compound $Ca_3(PO_4)_2$ compared with other treatments. However, Ba2, another strain of Barvar2, with mineralizing ability of 62.23 mg/l had the greatest ability in phosphate mineralization. The isolates used in Nitroxin had good results for production of auxin and siderophore. So, maximum production of auxin and siderophore were observed in N4 (15.13 mg/l) and N3, respectively. Isolate N3 produced largest orange zone in qualitative assay and 124.54 µm siderophore in quantitative methods, respectively. The isolates, Ba1 and Bio1 had highest ability to release potassium from the Muscovite and Biotite respectively compared with other treatments. In view of the PGPR features, Biofertilizers Barvar2 and Nitroxin had a better situation. Biofertilizer Biosuperphosphate was in the next order but isolates used in Supernitroplus had the weakness results.

Key words: PGPR, Biofertilizer, Phosphate solubilizing, Production of auxin and siderophore

1- MSc Student of Soil Biology and Biotechnology University of Tabriz
2- Assistant Professor of Soil Biology and Biotechnology, Department of soil science, University of Tabriz
3- Professor of Soil Biology and Biotechnology, Department of soil science, University of Tabriz
4- Assistant Professor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz
* Corresponding Author: rsarikhani@yahoo.com