بررسی برخی از ویژگی‌های کیفی کودهای زیستی رایج کشور

محمدرضا ساریخانی[1*]، سعیده انصاری[2]

تاریخ دریافت: 93/03/12 تاریخ پذیرش: 93/08/05

1- استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

بهره‌مندی از اثرات مفید و سودمند کودهای زیستی منوط به رعایت جنبه‌های کنترل کیفی کودهای مذکور است. بر این اساس در این مطالعه کیفیت چهار نوع کود زیستی رایج کشور شامل کود زیستی بارور2، بیوسوپرفسفات، نیتروکسین و سوپرنیتروپلاس به لحاظ تعداد جمعیت میکروبی، جدایه‌های مورد استفاده در آن (جداسازی و برخی تست‌های بیوشیمیایی) مطالعه شد. همچنین برخی ویژگی‌های PGPR ای کودها اعم از انحلال فسفات، آزادسازی پتاسیم، تولید اکسین و سایدروفور در قالب طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن پنج تیمار شامل شاهد و چهار تیمار کودی و سه تکرار تعیین و اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از شمارش جمعیت میکروبی در محیط‌های عمومی و نیمه-اختصاصی حاکی از جمعیت قابل قبول باکتریها در کود زیستی سوپرنیتروپلاس و بارور2 (10^8cfu/mL) بود. نتایج حاصل از جداسازی جدایه‌های به کار رفته در کودهای زیستی بر اساس ویژگی‌های ساختاری حاکی از آن بود که در کود بارور2 دو جدایه (Ba1-Ba2)، بیوسوپرفسفات 4 جدایه (Bio1-Bio4)، نیتروکسین 5 جدایه (N1-N5) و سوپرنیتروپلاس دو جدایه (Sn1-Sn2) حضور دارد. همچنین بیشترین میزان انحلال فسفات از تری‌کلسیم فسفات به‌ترتیب با مقادیر نزدیک به 400 و 350 میلی‌گرم بر لیتر برای بیوسوپرفسفات و بارور2 به دست آمد و در تولید اکسین (IAA) نیز کودهای نیتروکسین و بارور2 موفق عمل کردند. در مورد ویژگی تولید سایدروفور، همه کودهای زیستی به جز بارور2 قادر به تولید سایدروفور در محیط CAS-agar بودند. کودهای زیستی مورد مطالعه در این تحقیق گرچه از برخی جنبه‌های کیفی مورد ارزیابی قرار گرفتند اما تعیین جنس و گونه‌های باکتریایی بکار رفته در آنها و همچنین ویژگی‌های محرک رشدی هر جدایه، نیازمند انجام آزمایشات بیشتری است.

واژه‌های کلیدی: بارور2، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس، کود زیستی، نیتروکسین

Assessment of Some Qualitative Characteristics of Common Biofertilizers in Iran

Mohammad Reza Sarikhani[1*], Saeedeh Ansari[2]

Received: June 1, 2012 Accepted: October 27, 2014
1-Assist . Prof., Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Iran.
2- MSc Student of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
*Corresponding Author: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

The beneficial effects of biofertilizers can only be achieved if adequate quality control of biofertilizers is available. However, quality control assessment of four common types of biofertilizers in Iran including Barvar2, Biosuperphosphate, Nitroxin and Supernitroplus was the aim of this study. The targets of this research were counting viable numbers of microorganisms which present in the biofertilizers over the shelf life of the product, isolation and biochemical identification of isolates in each biofertilizer and determination of PGPR feauters. PGPR features of biofertilizares (5 treatments) such as phosphate solubilizing, potassium releasing ability, auxin and siderophore production were tested in a completely randomized design with three replications. Treatments were: control, Nitroxin, Barvar2, Biosuperphosphate and Supernitroplus. The results of counting of microbial viable cells in the general and semi-selective media indicated acceptable number of viable cells in Supernitroplus and Barvar2 (10^8 cfu/mL), respectively. The results of the identification and confirmation of isolates which used in the biofertilizers showed that two isolates (Ba1 and Ba2) exist in Barvar2, two isolates (Sn1 and Sn2) are in Supernitroplus, 4 isolates (Bio1-Bio4) and 5 isolates (N1-N5) are present in Biosuperphosphate and Nitroxin, respectively. Furthermore, the highest amount of phosphate solubility from tricalcium phosphate source were gained for Biosuperphosphate and Barvar2, with values close to 400 and 350 mg/L respectively. Nitroxin and Barvar2 were successful in the production of auxin. All biofertilizers with an exception Bratvar2 were able to produce siderophore on CAS-agar medium. Although some quality characteristics of biofertilizers were determined in this study but identification of genus and species of bacteria which have been used in these biofertilzers and PGPR features of each isolate should be considered in the new researchs.

Keywords: Barvar2, Biofertilizer, Biosuperphosphate, Nitroxin, Supernitroplus

مقدمه

امروزه استفاده از کودهای زیستی با توجه به هزینه زیاد کودهای شیمیایی و مسایل زیست محیطی که به دنبال دارند با اقبال بیشتری مواجه شده است (بی‌نام 2006). در مورد کودهای زیستی تعاریف متفاوت و همسویی وجود دارد که به آن اشاره می‌شود. کودهای زیستی، حاوی فرمولاسیونی از ریزجانداران زنده (باکتری‌ها و قارچ‌های سودمند) یا متابولیت‌های تولیدی آنها می‌باشند که از طریق روش‌هایی همانند تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات، رهاسازی یون پتاسیم، تأمین آهن و دیگر عناصر به بهبود تغذیه گیاه کمک نموده و علاوه بر آن با کاهش بیماری‌ها، بهبود ساختمان خاک و سایر اثرات مفید باعث تحریک بیشتر رشد گیاه شده و افزایش کمیت و کیفیت محصول را به دنبال دارند (بی‌نام 2006). وسی (2003) واژه کود زیستی را این‌طور تعریف می‌کند "ماده ای که شامل ریزجانداران زنده بوده و زمانی که در سطح گیاه، به همراه بذر یا در خاک استفاده می‌شود قادر به کلنیزه کردن[1] ریزوسفر و سطوح داخلی گیاه[2] بوده و تحریک رشد گیاه میزبان خود را از طریق تامین یا فراهمی عناصر غذایی به همراه دارد".

مهمترین دلیل استفاده از این نوع کودها، بالا بردن عملکرد محصول، ارتقای کیفیت و کمیت برخی پارامترهای شاخص در محصولات زراعی و باغی، گیاهان دارویی، زینتی و همچنین برخی از صیفی‌جات در کنار کاهش آلودگی ناشی از مصرف کودهای شیمیایی می‌باشد. در حال حاضر کودهای زیستی نیتروژنی و فسفاتی در بخش کشاورزی دارای بیشترین استفاده می‌باشند که جنس و گونه‌های PGPRای رایج و غالب به کاربرده شده در تولید این نوع کودها، عمدتاً شامل جنس‌های *سودوموناس*، *باسیلوس*، *آزوسپیریلوم* و *ازتوباکتر* می‌باشند (رودریگرز و فراگا 1999).

استفاده از کودهای زیستی تولید شده در کشور و نمونه‌های وارداتی در برخی از موارد اثربخش بوده و تأثیر معنی‌داری بر عملکرد برخی محصولات زراعی از جمله گندم، جو و حبوبات داشته است اما در برخی موارد این نوع کودها اثربخش نبوده و انتظارات را برآورده نکرده‌اند. پرواضح است زمانی می‌توان از اثرات مثبت این نوع کودها در شرایط مزرعه‌ای و گلخانه‌ای بهره برد که تمامی موارد مربوط به کنترل کیفیت این نوع کودها بسته به نوع سویه‌های مؤثر و برخی ویژگی‌های PGPR ای آنها بر طبق استانداردهای جهانی رعایت شده باشد (دیکر و همکاران 2011). بدیهی است که کیفیت مایه تلقیح استفاده شده در این نوع کودها نیز سهم و نقش به‌سزایی در اثربخشی کودهای زیستی مورد نظر دارد. به هر حال بهره مندی از منافع ناشی از کودهای زیستی زمانی حاصل خواهد شد که کیفیت لازم در تهیه مایه تلقیح یا زادمایه این کودها بکار گرفته شود (دیکر و همکاران 2011).

کنترل کیفیت کودهای زیستی فرایندی چند مرحله‌ای بوده و مجموعه‌ای از آزمایشات نظیر آزمون‌های آزمایشگاهی، گلدانی و مزرعه‌ای را شامل می‌شود. کنترل کیفیت کودهای زیستی شامل مواردی از قبیل تعیین جمعیت میکروبی، تایید حضور جنس‌ها و گونه‌های مورد استفاده در کود، عدم وجود آلودگی میکروبی، توانایی انحلال فسفات معدنی و آلی نامحلول، توانایی سنتز اکسین و قدرت رهاسازی پتاسیم از کانی-های حاوی پتاسیم، ... و همچنین ارزیابی پاسخ گیاهان به تلقیح آنها می‌باشد (دیکر و همکاران 2011).

برای تائید حضور گونه‌های کارا و همچنین حضور جمعیت فعال میکروبی در مدت زمان اعتبار کود زیستی، انجام کنترل کیفیت لازم می‌باشد. علاوه بر آن برای درک این مطلب که آیا در شرایط طبیعی واقعاً کارسازند و می‌توانند از مصرف کودهای شیمیایی بکاهند، آزمایشات مزرعه‌ای لازم است. یکی از موارد ضروری در انجام تست‌های کنترل کیفیت آگاهی از

[1]- Colonizes
[2]- Interior of Plant

تعداد باکتری می‌باشد. برای این منظور بعد از تهیه سری‌های رقت ده‌دهی (10 برابری) در آب مقطر استریل از سری‌های رقت بر روی پلیت حاوی محیط‌های انتخابی یا افتراقی انتقال داده می‌شود (دیکر و همکاران 2011). از محیط‌های عمومی یا اختصاصی برای سویه‌های مختلف میکروبی می‌توان بهر برد به صورتی‌که از محیط Pikovskaya برای حل‌کنندگان فسفات، از محیط N-free (NF) برای ازتوباکترها، از محیط N-free bromothymol blue (NFb) برای *آزوسپیریلوم* و ... می‌توان استفاده نمود (هوسن و همکاران 2007، دیکر و همکاران 2011 و موتسارا و روی 2008).

یکی از موارد مهم در مورد مایه تلقیح کودهای زیستی، عدم وجود آلودگی میکروبی در آن می‌باشد به صورتی‌که سویه‌های ناخواسته در کود زیستی حضور نداشته باشند. البته رخداد این آلودگی می‌تواند در مراحل مختلف تهیه کود زیستی از قبیل فرمانتاسیون، استفاده از حامل یا بسته‌بندی رخ دهد. در برخی از منابع عدم مشاهده آلودگی در رقت‌های 10^{-5} یا 10^{6} یکی از استانداردهای پذیرفته شده در مورد این نوع کودها می‌باشد (دیکر و همکاران 2011، موتسارا و روی 2008)

در مطالعه‌ای که بین سال‌های 2004 تا 2006 بر روی کودهای زیستی رایج در کشور اندونزی انجام گرفت. نزدیک به 41 کود مورد مطالعه کنترل کیفی قرار گرفت (هوسن و همکاران 2007). در اغلب این کودها از دو یا تعداد بیشتری میکروارگانیسم استفاده شده بود و مقادیر عناصر NPK در برخی از آنها معادل کودهای آلی گزارش شد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که این کودها دارای رفتار حل کنندگی فسفات و تثبیت کنندگی نیتروژن می‌باشند و از میان کودهای زیستی، 5 کود دارای جمعیت میکروبی فعال کمتری نسبت به مشخصات قید شده در ویژگی‌های مربوط به کود بودند. همچنین 3 کود زیستی دارای جمعیت کمتر از 10^{3} cfu/mL بودند (هوسن و همکاران 2007). ویژگی‌های حل‌کنندگی فسفات و تولید اکسین این کودها نیز در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت.

تولید و عرضه محصولات زیستی بخشی از نیاز کشور را به این‌گونه محصولات تامین می‌کند اما پایش کنترل کیفیت آنها نیز بخش لاینفک می‌باشد، در مواردی استفاده از کودهای زیستی همواره اثر بخش نبوده و انتظارات لازم را برآورده نمی‌سازد، صرف نظر از سایر عوامل تاثیرگذار در این امر (اعم از نوع محصول، شرایط خاک، شرایط محیطی، شرایط آزمایش و ...)، یکی از عوامل عمده و مهم، کیفیت کود زیستی می‌باشد. بدین خاطر ضرورت آن احساس می‌شود که در مطالعه‌ای به ارزیابی کیفی برخی کودهای زیستی کشور پرداخت. خاطر نشان می‌شود که بهره‌گیری از کودهای زیستی در کشاورزی و مشاهده اثرات مثبت آنها منوط به رعایت جنبه‌های کیفی این کودها و استفاده از سویه‌های موثر با توجه به ویژگی PGPR آنهاست. بر این اساس در این پژوهش چهار نوع کود زیستی رایج در کشور شامل بارور2، بیوسوپرفسفات، نیتروکسین و سوپرنیتروپلاس از لحاظ ویژگی‌های فوق مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند و این تحقیق با اهداف زیر دنبال شده است:

1- ارزیابی کودهای زیستی رایج در کشور (شامل بارور2، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین) اعم از وجود جمعیت فعال میکروبی و جداسازی ایزوله‌های مورد استفاده در هر کود بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی

2- تعیین ویژگی‌های محرک رشدی گیاه کودهای زیستی (از قبیل حل کنندگی فسفات، رهاسازی پتاسیم، تولید اکسین و سایدروفور) در شرایط درون شیشه‌ای

مواد و روش‌ها

چهار کود زیستی رایج در کشور شامل نیتروکسین، سوپرنیتروپلاس، بیوسوپرفسفات (تولیدی شرکت فناوری زیستی مهر آسیا هر سه محصول به صورت مایع) و بارور2 (تولیده شده در شرکت زیست فناور سبز به صورت جامد) تهیه و از نظر عناصر NPK، جمعیت میکروبی و ویژگی‌های PGPR ای مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های به دست آمده از هر کود در محیط‌های کشت عمومی یا نیمه‌اختصاصی بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و ریخت‌شناسی جداسازی شد و آزمون‌های ساده‌ای نظیر رنگ‌آمیزی گِرم، اندوسپور، تست کاتالاز، اکسیداز، ویژگی فلورسنتی و ... بر روی آنها انجام پذیرفت.

غلظت عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم موجود در کودهای زیستی مایع و تنها کود بر بستر جامد با استفاده از روش‌های مرسوم (والینگ و همکاران 1989، اولسن و سامرز 1982 و جونز 2001) اندازه‌گیری شد که نتایج آن در جدول 1 آورده شده است. در مورد کود جامد بارور2 و کودهای مایع برای تعیین غلظت دو عنصر فسفر و پتاسیم ابتدا رقت 10^{-2} از کود تهیه و با تهیه استانداردهای فسفر و پتاسیم و با استفاده از منحنی کالیبراسیون برازش داده شده غلظت این دو عنصر تعیین شد. برای تعیین غلظت نیتروژن، با توزین 1 گرم از کود مذکور در 2 تکرار هضم نمونه‌ها با اسید سولفوریک غلیظ 96% انجام شد. برای کودهای مایع 1 میلی‌لیتر از خود کودها برای تعیین غلظت نیتروژن استفاده شد و در نهایت مقدار نیتروژن موجود در کودها با روش کجلدال و انجام تیتراسیون با اسید سولفوریک 0/02 نرمال محاسبه شد.

به منظور تعیین جمعیت میکروبی کودها، ابتدا سری‌های رقت تهیه شد و از رقت‌های پایانی (رقت 10^{-9}، 10^{-8}، 10^{-7}، 10^{-6} و 10^{-5}) در 2 تکرار به میزان 100 میکرولیتر بر روی محیط جامد عمومی انتقال داده شد، برای این منظور از محیط کشت عمومی (LB) Luria and Bertani استفاده شد (شکل 1). قابل ذکر است که این مرحله در محیط‌های کشت نیمه‌اختصاصی Sperber، NF و Nfb نیز انجام شد، اطلاعات مربوط به محیط کشت‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول 2 آورده شده است. برای تهیه اولین رقت (10^{-2}) یک میلی‌لیتر از کودهای زیستی مایع (در مورد کود جامد 1 گرم با فرض وزن ظاهری 1 گرم بر سانتی مترمکعب) به 99 میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد و سایر رقت‌ها تا رقت 10^{-9} در لوله های حاوی 9 میلی لیتر آب مقطر استریل با انتقال 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شد (دیکر و همکاران 2011).

علاوه بر شمارش میکروبی، جدایه‌های مورد استفاده در هر کود بر اساس ویژگی‌های ظاهری و ریختی کلنی‌ها جداسازی (شکل 2) و در ادامه برخی از آزمون‌ها و تست‌های بیوشیمیایی نظیر رنگامیزی گِرم، تست اکسیداز، مصرف قندها (روبرت کرانز و همکاران 2006) بر روی آنها انجام پذیرفت.

برای تعیین ویژگی‌هایی نظیر حل‌کنندگی فسفات، تولید اکسین، رهاسازی پتاسیم و همچنین تولید سایدروفور در کودهای زیستی به صورت زیر اقدام شد. قابل ذکر است که بررسی ویژگی انحلال فسفات در محیط جامد و مایع و تولید سایدروفور در محیط جامد و تولید اکسین و رهاسازی پتاسیم فقط در محیط مایع مورد ارزیابی قرار گرفت. در همه سنجش‌های انجام شده در محیط مایع یک نمونه شاهد بدون تلقیح میکروبی نیز در نظر گرفته شد که مقادیر مربوط به شاهد از تیمارهای کودی کسر شد.

برای بررسی میزان حل‌کنندگی فسفات نامحلول (تری‌کلسیم‌فسفات: با فرمول شیمیایی $Ca_3(PO_4)_2$ ساخت شرکت مرک آلمان) توسط کودهای زیستی، 500 میکرولیتر از رقت 10^{-2} هر کود زیستی در سه تکرار به ارلن‌های حاوی 30 میلی‌لیتر محیط Sperber مایع افزوده شد. پس از اتمام دوره انکوباسیون یک هفته‌ای با شرایط دمای 26 درجه سانتی‌گراد و سرعت

شیک 150 دور در دقیقه، با برداشت 2 میلی‌لیتر از محیط‌های مایع فوق و با رساندن به حجم 10 میلی‌لیتر (با آب مقطر) در لوله سانتریفیوژ، در دور5000 به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد، میزان حل‌کنندگی فسفات نامحلول توسط تیمارهای کود زیستی با روش وانادات – مولیبدات اندازه‌گیری شد (ساریخانی و همکاران 2013).

توان تولید ایندول استیک اسید کودهای زیستی انتخاب شده، با استفاده از محیط (NB) Nutrient Broth در سه تکرار انجام گرفت. برای این منظور 500 میکرولیتر از رقت 10^{-2} کود زیستی به 30 میلی لیتر محیط NB (حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر L - تریپتوفان یا فاقد آن) منتقل گردید و بعد از 72 ساعت، سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ (5000rpm و به مدت 10 دقیقه) و دو میلی‌لیتر از محلول صاف رویی با 4 میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی ($H_2SO_{4(12M)}+FeCl_{3(0.5M)}$) مخلوط شد. این مخلوط به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 530 نانومتر قرائت گردید و مقدار تولید IAA توسط هر کود از مقایسه جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد تهیه شده در غلظت‌های 0، 0/5، 1/5، 5، 7/5 و 10 میکروگرم در میلی‌لیتر IAA محاسبه شد (دیکر و همکاران 2011).

میزان رهاسازی پتاسیم هر کود زیستی با سه تکرار در محیط کشت الکساندروف مایع حاوی کانی موسکویت یا بیوتیت (این دو کانی به ترتیب از معادن میکای همدان و قره‌باغ ارومیه تهیه شدند) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا رقت 10^{-2} از کودهای زیستی تهیه و با تلقیح 500 میکرولیتر از آن در 30 میلی‌لیتر محیط الکساندروف مایع حاوی کانی میکای سفید یا سیاه (برای نمونه شاهد بدون تلقیح باکتری نیز 500 میکرولیتر از رقت 10^{-2} افزوده شد)، تحت شرایط انکوباسیون به مدت 1 هفته در دمای 26 درجه سانتی-گراد با شیک 150 دور در دقیقه انجام گرفت. بعد از اتمام زمان انکوباسیون 2 میلی‌لیتر از محیط‌های فوق برداشته شد و بعد از رساندن به حجم نهایی 10 میلی‌لیتر (با استفاده از آب مقطر) در شرایط سانتریفیوژ با دور 5000 به مدت 10 دقیقه، اجزاء محیط رسوب داده شد و از بخش روشناور برای تعیین میزان پتاسیم آزاد شده استفاده گردید (ساریخانی و همکاران 2013).

انجام بخش‌های مختلف آزمایش به ویژه بررسی ویژگی‌های PGPRای کودها اعم از انحلال فسفات، آزادسازی پتاسیم، تولید اکسین و سایدروفور در قالب طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن 5 تیمار (شامل شاهد و 4 تیمار کودی) و 3 تکرار تعیین و اندازه‌گیری شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار MSTATC استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز غلظت سه عنصر اصلی نیتروژن، فسفر و پتاسیم موجود در کودهای زیستی در جدول 2 آورده شده است. قابل ذکر است که غلظت عناصر فسفر و پتاسیم فقط میزان فسفر و پتاسیم محلول در آب است و درصد نیتروژن بیانگر میزان نیتروژن کل موجود در نمونه کود زیستی مورد آزمایش است.

جدول 1- اجزای محیط کشت (g/L) در محیط LB، Sperber، Nf، Nfb و Aleksandrov

محیط	LB	Sperber	Nf	Nfb	Aleksandrov
Agar	15	15	15	15	-
Trypton	10	-	-	-	-
NaCl	10	-	-	0/02	-
Glucose	-	10	-	-	5
$Ca_3(PO_4)_2$	-	2/5	-	-	2
Yeast Extact	5	0/5	-	-	0/1
$CaCl_2$	-	0/1	-	0/01	0/5
$MgSO_4.7(H_2O)$	-	0/25	0/5	0/01	-
Mallic acid	-	-	-	5	-
KOH	-	-	-	4	-
KH_2PO_4	-	-	0/8	-	0/005
$K_2H\ PO_4$	-	-	0/2	0/5	-
$NaMoO_3$	-	-	/005	/002	-
$FeSO_4$	-	-	-	0/05	-
$MnSO_4$	-	-	--	0/01	-
Bromthymol blue 1% (mL)	-	-	-	2	-
Sucrose	-	-	20	-	-
$FeCl_3$	-	-	0/5	-	-

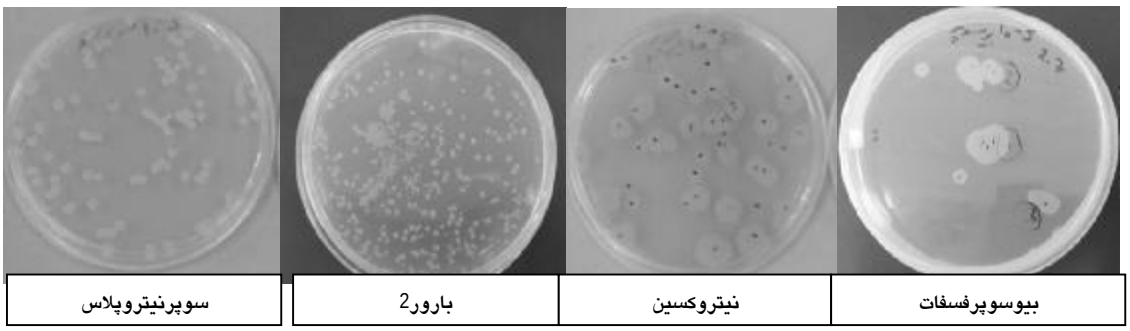
pH همه محیط‌ها بر روی 7 تنظیم و مورد استفاده قرار گرفت.

جدول 2- برخی پارامترهای اندازه‌گیری شده در کودهای زیستی

کود زیستی	%N	P	K	رطوبت (%)
		غلظت (mg/L)		
بارور2	0/15	7/9	0/7	%50
بیوسوپرفسفات	0/13	7/68	1/54	-
نیتروکسین	0/16	7/18	0/64	-
سوپرنیتروپلاس	0/05	8/18	0/9	-

شمارش جمعیت میکروبی

با توجه به اینکه جمعیت میکروبی موجود در هر میلی‌لیتر (مایع) یا هر گرم (جامد) کود زیستی به عنوان یکی از ملاک‌های سنجش کیفیت کود زیستی می‌باشد، مطابق گزارش این پژوهش کود زیستی سوپرنیتروپلاس با داشتن جمعیت $8/5\times10^{8}$cfu/mL بیشترین جمعیت میکروبی را در محیط Nfb دارا بود (جدول 3) این در حالی است که کودهای دیگر به غیر از نیتروکسین در این محیط فاقد جمعیت میکروبی بودند.



شکل 1- شمارش جمعیت میکروبی کودهای زیستی در محیط LB

کودهای زیستی بارور2، سوپرنیتروپلاس، نیتروکسین و بیوسوپرفسفات در محیط LB به‌ترتیب دارای جمعیت میکروبی $2/9\times10^{8}$، $1/3\times10^{8}$، $3/2\times10^{7}$ و $7/2\times10^{6}$ کلنی در هر میلی‌لیتر کود بودند و در محیط Sperber کودهای بارور2 و سوپرنیتروپلاس دارای رشد میکروبی همراه با هاله شفاف حاصل از حل‌کنندگی فسفات بودند (انصاری و ساریخانی 1392).

استانداردهای موجود در مورد کودهای زیستی نشان می‌دهد که بایستی جمعیت فعال و زنده بین 10^{6} تا 10^{9} به ازاء هر گرم حامل یا هر میلی‌لیتر کود زیستی باشد تا کود در زمان استفاده کلنیزاسیون بذر یا بستر کشت را به خوبی انجام دهد (دیکر و همکاران 2011). تفاوت‌هایی که در شمارش میکروبی در محیط کشت عمومی و نیمه‌اختصاصی دیده می‌شود را بایستی در ویژگی‌های اختصاصی سویه‌های بکار رفته در هر نوع کود زیستی جستجو نمود. گر چه تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین کودهای مایع و جامد دیده نمی‌شود اما به نظر ماندگاری جمعیت میکروبی بر روی بستر جامد نسبت به محیط مایع طولانی‌تر بوده (عدم وجود شرایط تهویه مناسب برای کودهای زیستی مایع بقاء میکروارگانیسم-ها را تحت تاثیر قرار داده و کاهش جمعیت میکروبی را به دنبال دارد) و این یک مزیت برای کود زیستی می‌تواند باشد اما از طرف دیگر فرایند تهیه کودهای زیستی مایع به مراتب ساده‌تر از تولید کودهای زیستی دارای حامل می‌باشد. در مطالعه ای که بین سال‌های 2004 تا 2006 بر روی کودهای زیستی رایج در کشور اندونزی انجام گرفت. نزدیک به 41 کود مورد مطالعه کنترل کیفی قرار گرفت. از میان 5 کود مورد آزمایش قرار گرفته، دو کود جامد دارای جمعیت میکروبی بیشتر و بالاتر با رنج 10^{6} تا 10^{9} کلنی برای هر گرم کود بود در حالی‌که برای کودهای مایع این رنج cfu/mL 10^{6}-10^{4} بود (هوسن و همکاران 2007).

جدول3- نتایج شمارش جمعیت میکروبی در کودهای زیستی

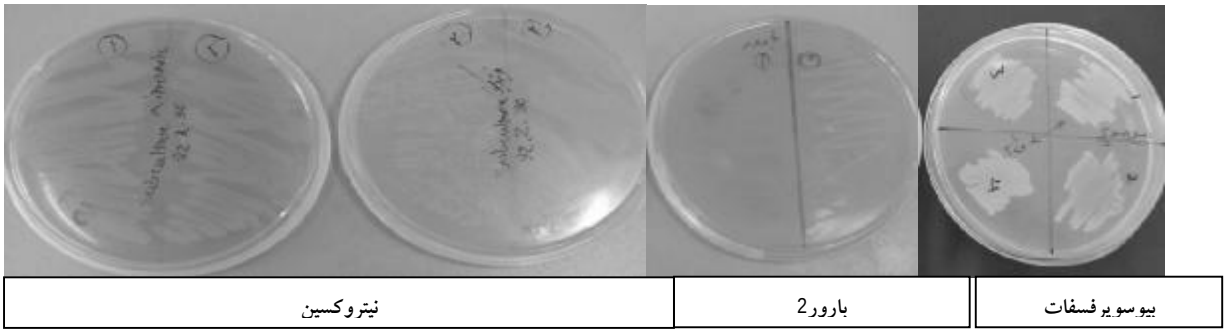
محیط کشت / کود زیستی	LB	Sperber	NF	Nfb
بارور2	$2/96\times10^{8}$	$4/2\times10^{8}$	-	-
بیوسوپرفسفات	$7/2\times10^{6}$	-	-	-
نیتروکسین	$3/2\times10^{7}$	-	$3/7\times10^{7}$	$4/2\times10^{7}$
سوپرنیتروپلاس	$1/3\times10^{8}$	$2/8\times10^{8}$	$7/1\times10^{7}$	$8/5\times10^{8}$

جدایه‌های موجود در هر کود زیستی و برخی تســت‌هــای بیوشیمیایی ساده

بعد از شمارش جمعیت میکروبی در محیط‌های مختلف، اقدام به جداسازی جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ریختی شد که بر این اساس از کود نیتروکسین 5 جدایه (N1-N5)، از کود سوپرنیتروپلاس دو جدایه (Sn1 و Sn2)، از کود بارور2 دو جدایه (Ba1 و Ba2) و از کود بیوسوپرفسفات (Bio1-Bio4) جداسازی شدند. همچنین برخی تست‌های بیوشیمیایی به منظور بررسی‌های تکمیلی انجام گرفت که تست کاتالاز، اکسیداز، ویژگی فلورسنتی، تست اوره‌آز و ... از جمله آنها بود. نتایج برخی از آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده بر روی این جدایه‌ها در جدول 4 آورده شده است.

جدول4- برخی نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی

کود زیستی	جدایه‌های موجود در کود زیستی	رنگ امیزی گِرم	اکسیداز	تریپتوفان	لاکتوز	گلیسرول	ایندول	اوره‌آز	نیترات رداکتاز	ویژگی فلورسنتی در محیط King B
	N1	Gram -	+	+	-	-	-	+	+	+
	N2	Gram -	+	+	-	-	-	-	+	+
نیتروکسین	N3	Gram -	-	+	+	+	-	+	+	-
	N4	Gram -	-	+	-	-	-	-	-	-
	N5	Gram -	+	+	-	-	-	+	+	+
سوپرنیتروپلاس	SN1	**Gram +**	-	-	-	-	-	+	+	-
	SN2	Gram -	+	+	-	-	-	+	+	+
بارور2	Ba1	Gram -	-	+	+	+	-	-	+	-
	Ba2	Gram -	+	+	-	-	-	-	-	-
بیوسوپرفسفات	Bio1	Gram -	+	+	-	-	-	+	-	-
	Bio2	Gram -	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bio3	Gram -	+	+	-	-	-	+	+	+
	Bio4	**Gram +**	-	-	-	-	-	+	+	-



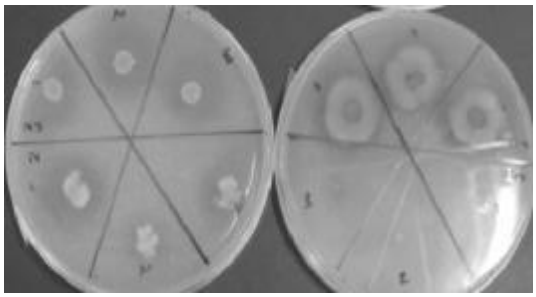
شکل 2- نمونه‌ای از جدایه‌های به دست آمده از کود زیستی بارور2، نیتروکسین و بیوسوپرفسفات

لازم به ذکر است که شناسایی بیشتر جدایه‌ها به روش مولکولی (16S rDNA) و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی در حال انجام است تا نوع جنس و گونه باکتری‌ها مشخص شود.

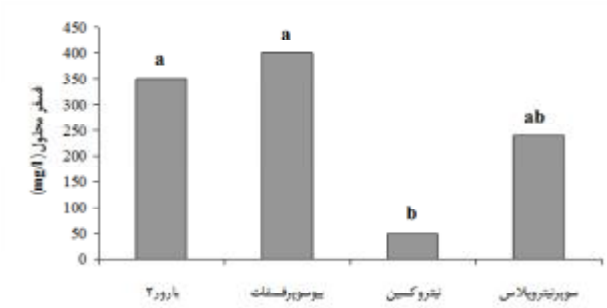
توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول (محیط جامد و مایع)

توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول توسط کودهای زیستی در سه تکرار در محیط اسپربر معدنی جامد محاسبه گردید (شکل 3). اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) مشخص کرد که کود زیستی سوپرنیتروپلاس با دارا بودن مقدار 1/83برای نسبت (HD/CD) قدرت بالایی در امر انحلال فسفات معدنی نامحلول داشت و سه کود بارور2، نیتروکسین و همچنین کود بیوسوپرفسفات به‌ترتیب با دارا بودن نسبت‌های 1/45، 1/39 و 1/1، در رتبه‌های بعدی قرار داشتند.

همچنین توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول توسط این نوع کودها در محیط Sperber مایع بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین کودهای زیستی مذکور از لحاظ قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول (تری‌کلسیم‌فسفات) در محیط Sperber مایع تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 1% وجود دارد. کود زیستی بیوسوپرفسفات و بارور2 با بیشترین میزان حل‌کنندگی و به‌ترتیب با مقادیری برابر با 408/3 و 367/3 میلی‌گرم بر لیتر فسفر و کود زیستی نیتروکسین



شکل 3- تشکیل هاله شفاف توسط کودهای زیستی



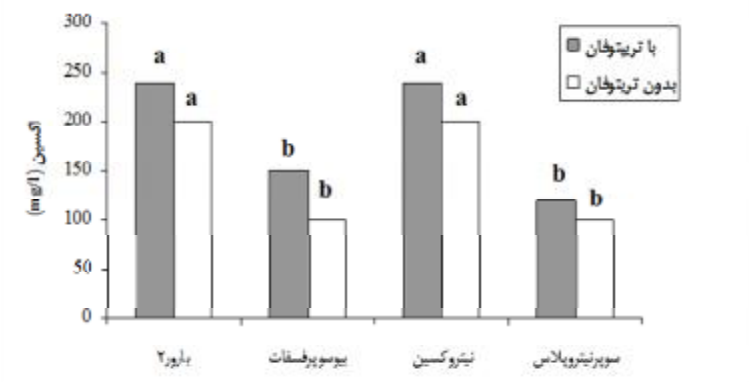
شکل 4- میانگین قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول در تیمارهای کود زیستی

کمترین میزان حل‌کنندگی (46/1 میلی‌گرم بر لیتر) را داشتند (شکل 4). به نظر توجه به ویژگی انحلال فسفات در محیط مایع نسبت به محیط جامد مهم‌تر باشد هر چند که در غالب مطالعات پایش هاله شفاف تولیدی یکی از روش‌های غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات است (رودریگز و فراگا 1999).

کودهای زیستی بارور2 و بیوسوپرفسفات جز کودهای زیستی فسفاته هستند که جنس باکتری‌های به کار گرفته شده در آن متعلق به جنس‌های *پانتوآ*، *سودوموناس* و *باسیلوس* می‌باشد. این باکتری‌ها نقش مهمی در حل‌کنندگی فسفات نامحلول خاک دارند، بنابراین انتظار نیز بر این بود که کودهای مذکور بیشترین حل‌کنندگی را برای فسفات نامحلول داشته باشند. سویه‌های حل‌کنندگان فسفات با تولید اسیدهای آلی همانند؛ اگزالیک اسید، ملانیک اسید، سوکسینیک اسید و همچنین ترکیباتی از قبیل لاکتیک اسید، ایزوبوتیریک اسید و استیک اسید قادر به انحلال فسفات نامحلول هستند (بی‌نام 2006).

توان تولید اکسین

توان تولید اکسین توسط کودهای زیستی مذکور در حضور تریپتوفان و عدم حضور تریپتوفان مورد بررسی قرار گرفت و بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. کود بارور2 و نیتروکسین بیشترین مقدار سنتز اکسین را در حضور تریپتوفان (230/6 و 218/7 میلی‌گرم بر لیتر) داشتند که در عدم حضور تریپتوفان نیز کودهای مذکور از لحاظ مقدار سنتز اکسین (201/9 و 190/4 میلی‌گرم بر لیتر) با همدیگر هیچ تفاوتی نشان ندادند (شکل 5). کود بیوسوپرفسفات و سوپرنیتروپلاس نیز از نظر تولید اکسین در حضور تریپتوفان و عدم حضور آن تفاوتی با همدیگر نداشتند.



شکل 5- توان تولید اکسین توسط چهار کود زیستی

همانطور که از شکل 5 برمی‌آید تولید اکسین در سویه‌های به کار رفته در کودهای زیستی گرچه تحت تاثیر تریپتوفان روند افزایشی نشان داده اما به نظر تولید اکسین وابسته به تریپتوفان افزوده شده نمی‌باشد زیرا که اختلاف معنی‌دار در حضور و عدم حضور آن دیده نمی‌شود. قابل ذکر است که محیط ارزیابی تولید اکسین محیط کشت NB بوده است که به دلیل استفاده از عصاره مخمر در آن حضور اسیدآمینه پیش‌ساز اکسین وجود خواهد داشت. در غالب مطالعات پایش تولید اکسین معمولاً از محیط کشت‌های معدنی تعریف شده فاقد تریپتوفان استفاده می‌شود.

کود بارور2 به عنوان یک کود فسفاتی شناخته شده، اما با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده شد که این کود دارای توان سنتز اکسین حتی با غلظت بالاتر از کودهای نیتروژنی بود. از طرفی کودهای زیستی نیتروکسین و سوپرنیتروپلاس جزء کودهای زیستی نیتروژنی بوده که جنس باکتری‌های غربال شده برای آن متعلق به جنس *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم* می‌باشد. این باکتری‌ها تثبیت‌کننده نیتروژن بوده و در تولید هورمون‌هایی نظیر اکسین نقش فعالی دارند. در بررسی که بر روی اثرات محرک رشدی سویه‌های بومی *ازتوباکتر* کروکوکوم بر رشد، عملکرد و جذب عناصر

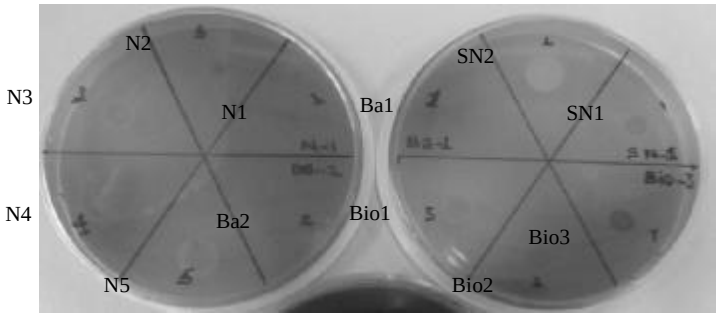
غذایی گیاه گندم در خاک‌های استان چهارمحال بختیاری انجام گرفت، مشخص شد که از بین 70 سویه جداسازی شده *ازتوباکتر* در 75 خاک ریزوسفری تنها سه سویه AZT-13، AZT-72 و AZT-25 قادر به تولید اکسین در غلظت‌های 70، 67 و 72 میلی‌گرم بر لیتر بودند (رجایی و همکاران 1386).

توان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قدرت رهاکنندگی پتاسیم از کانی‌های مسکوویت و بیوتیت نشان داد که کودهای زیستی یادشده فاقد اثر معنی‌دار بر رهاسازی پتاسیم هستند این در حالی است که وقتی سویه P13 بکاربرده شده در کود زیستی بارور2 به تنهایی مورد ارزیابی قرار گرفت قادر به آزادسازی پتاسیم به مقدار 6/5 mg/g بود و در مقایسه با شاهد باعث افزایش 27/24% شد اما سویه P5 با نمونه شاهد تفاوتی را نشان نداد (ساریخانی و همکاران 2013).

توان تولید سیدروفور

نتایج حاصل از کشت نقطه‌ای جدایه‌های جدا شده از کودهای زیستی در محیط CAS-agar حاکی از توان جدایه‌های کود زیستی نیتروکسین، بیوسوپرفسفات و سوپرنیتروپلاس در ایجاد هاله شفاف زردرنگ به دلیل تولید سیدروفور در این محیط بود. دو ایزوله N3 و N5 کود نیتروکسین، ایزوله Sn2 کود سوپرنیتروپلاس و ایزوله Bio3 کود بیوسوپرفسفات چنین ویژگی از خود نشان دادند (شکل 6). ایزوله Sn2 سوپرنیتروپلاس از لحاظ تولید سیدروفور توانایی بیشتری داشته و دو ایزوله N3 و N5 کود نیتروکسین، و همچنین ایزوله Bio3 کود بیوسوپرفسفات تا حدودی بدین لحاظ یکسان عمل کرده‌اند. ایزوله Sn1 کود سوپرنیتروپلاس روز هفتم هاله زردرنگ از خود نشان داد ولی با این حال هاله شفاف زردرنگ حاصل از تولید سایدروفور آن نیز قابل قیاس با هاله زردرنگ سه ایزوله آخر بود.



شکل 6-توانایی تولید سیدروفور 12 جدایه کودهای زیستی در محیط CAS-agar

در بررسی که توسط موسسه تحقیقات خاکشناسی اندونزی (2003) از 40 خاک ریزوسفری فیلیپین با هدف غربالگری باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه و با تکیه بر ویژگی‌های PGPRای در شرایط in vitro و آزمایشگاهی انجام گرفت، مشخص شد که از بین 12 ایزوله غربال شده و کارآمد، هفت ایزوله BS 58، BTS، BTCaRe 60، TCaR61TCeRe، TCeRe 68، 65BTCaRe و Mac 259 قادر به رشد و ایجاد هاله زرد رنگ حاصل از انحلال آهن (Fe^{3+}) کمپلکس شده با CAS در محیط CAS-agar بودند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج شمارش میکروبی نشان داد که جمعیت باکتریها به ازای هر گرم یا میلی‌لیتر در دامنه 10^8 برای کودهای سوپرنیتروپلاس و بارور2 تا 10^6 برای کود بیوسوپرفسفات متغیر بود، تعداد جمعیت در کود

نیتروکسین 10^7 به دست آمد. همچنین جداسازی جدایه‌های مورد استفاده در کودها نشان داد که در کود نیتروکسین، بیوسوپر فسفات، سوپرنیتروپلاس و بارور2 به‌ترتیب 5، 4، 2 و 2 جدایه متفاوت از نظر فنوتیپ وجود دارد که شناسایی های بیشتر بیوشیمیایی و مولکولی بر روی آنها در حال انجام است.

بیشترین آزادسازی فسفر در حضور منبع تری‌کلسیم فسفات به‌ترتیب با مقادیر تقریبی 400 و 350 میلی‌گرم بر لیتر برای کودهای بیوسوپرفسفات و بارور2 به دست آمد و سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین با مقادیر نزدیک به 240 میلی‌گرم بر لیتر در رتبه‌های بعدی بودند. از نظر تولید اکسین نیز کود بارور2 و نیتروکسین شرایط مشابهی داشتند (240 میلی‌گرم بر لیتر) و نسبت به کودهای بیوسوپرفسفات و سوپرنیتروپلاس اکسین بیشتری را تولید نمودند. از نظر تولید سایدروفور به جز کود بارور2 بقیه کودها قادر به ایجاد هاله نارنجی/زرد در محیط CAS-Agar بودند. این در حالی است که هیچ یک از کودها در آزادسازی پتاسیم از کانیهای میکا در محیط مایع الکساندروف در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند. گرچه کودهای زیستی مورد مطالعه در این تحقیق از برخی جنبه‌های کیفی مورد ارزیابی قرار گرفتند اما تعیین جنس و گونه جدایه‌های باکتریایی به دست آمده از هر کود بایستی صورت پذیرد تا این موضوع مشخص شود که باکتری‌های مورد استفاده منطبق بر ادعای کارخانه سازنده است یا خیر (جدول 5)؟ و این به تشخیص وجود آلودگی در کود زیستی نیز کمک خواهد نمود. همچنین ویژگی‌های محرک رشدی هر جدایه به تنهایی نیز مورد بررسی قرار گیرد که انجام این موارد نیازمند انجام آزمایشات بیشتری است و در حال انجام می‌باشد.

جدول 5- اطلاعات قید شده از طرف تولیدکنندگان کودهای زیستی مورد آزمایش در این تحقیق

کود	جنس و گونه باکتری	برخی ویژگی‌ها	تاریخ اعتبار
بیوسوپرفسفات	*Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp.	10^7 کلنی باکتری برای هر یک از جنس-های باکتری در هر میلی‌لیتر کود	91/12/10-92/6/10
بارور2	*Pantoea agglomerans* *Pseudomonas putida*	بهبود ساختمان خاک، کاهش بیماری‌های خاکزاد و افزایش محصول	92/7/8 (سری تولید 540c)
نیتروکسین	*Azospirillum* sp. *Azotobacter* sp.	10^8 کلنی برای هر یک از جنس‌های باکتری در هر میلی‌لیتر از کود	92/8/8-91/12/8
سوپرنیتروپلاس	*Bacillus subtillis* *Pseudomonas* sp. *Azospirillum* sp.	10^7 باکتری تثبیت‌کننده ازت ومحرک رشد در هر میلی‌لیتر کود و 10^8 اسپور و سلول زنده *Bacillus*	92/4/10-91/10/19

قدردانی و تشکر

این مقاله مستخرج از گزارش نهایی طرح پژوهشی "ارزیابی برخی از کودهای زیستی رایج در کشور در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای" می باشد که از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تبریز اجرا گردیده است. بدین وسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه ابراز می‌دارند.

منابع مورد استفاده

انصاری س، ساریخانی م ر، 1392. بررسی برخی از ویژگیهای کیفی کودهای زیستی رایج در کشور. سیزدهمین کنگره علوم خاک ایران. 10-8 بهمن، اهواز، ایران.

رجایی س، علیخانی ح و رئیسی ف، 1386. اثر پتانسیل‌های محرک رشد سویه‌های بومی *ازتوباکتر کروکوکوم* روی رشد، عملکرد و جذب عناصر غذایی در گندم، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، 11(4): 296-285.

Anonymous, 2006. Biofertilizer Manual, FNCA Biofertilizer Project Group. Japan Atomic Industrial Forum.

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 and Robert Kennedy I, 2011. Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers. Australian Center for International Agricultur Resaerch.

Husen E, Simanungkalit RD, Saraswati R and Irawan, 2007. Characterization and quality assessment of Indonesian commercial biofertilizers. Indonesian Journal of Agriculture Science, 8(1): 31-38.

Jones B, 2001. Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. CRC Press, USA.

Motsara MR, Roy RN, 2008. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. Rome.

Olsen SR and Sommers LE, 1982. Phosphorus P, 403-430. In: Page et al. (eds) Methods of soil Analysis. Part Π, 2ed. ASA, SSSA, Madison .WI .USA.

Rodriguez H, and Fraga R, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17:319-339.

Rowell DL, 1994. Soil science: Method and application. Longman Scientific and Technical, Wiley, UK, P, 350.

Sarikhani MR, Ebrahimi M, Oustan S, and 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 Crisis and its Solutions. Feb 13-14, Islamic Azad University, Khouzestan, Kish Islan, Iran.

Waling I, Vark WV, Houba VJ and Van Der Lee JJ, 1989. Soil and plant analysis, a series of syllabi. Part 7. Plant Analysis Procedures. Wageningen Agriculture University, Netherland.

Vessy K, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizars. Plant and Soil, 255: 571-586.