نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۵ شماره ۴/۲ صفحه‌های ۱۳ تا ۲۶ / سال ۱۳۹۴

شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی مورد استفاده در برخی از کودهای زیستی کشور

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

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۲/۱۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی خاک- دانشکده کشاورزی- دانشگاه تبریز
۲- استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک - دانشکده کشاورزی- دانشگاه تبریز
۳- استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک - دانشکده کشاورزی- دانشگاه تبریز
* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

بهره‌گیری از کودهای زیستی در کشاورزی منوط به استفاده از سویه‌های مؤثر و کارآمد با ویژگی مطلوب تحریک‌کنندگی رشد گیاه است. کنترل کیفیت کودهای زیستی به‌ویژه از نظر بررسی و تأیید جنس و گونه باکتری مورداستفاده در کود زیستی یکی از معیارهای مهم به شمار می‌رود. بر این اساس در این پژوهش جدایه‌های موجود در چهار نوع کود زیستی فسفاتی و نیتروژنی رایج کشور شامل بارور۲ (Ba1 و Ba2)، بیوسوپرفسفات (Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4)، سوپرنیتروپلاس (Sn1 و Sn2) و نیتروکسین (N1، N2، N3 ، N4 و N5) از نظر صحت جنس و گونه موردبررسی قرار گرفتند. از روش شناسایی مولکولی مبتنی بر تکثیر ژن 16S rDNA به کمک آغازگرهای 27F و 1492R استفاده شد، همچنین با انجام تست‌های بیوشیمیایی مناسب اقدام به تعیین جنس و گونه باکتری مورداستفاده در کودهای زیستی شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های N1، N5، Sn2 و Bio3 از نظر فنوتیپ مشابه و همگی متعلق به جنس *Pseudomonas* هستند همچنین جدایه‌های Sn1 و Bio4 نیز تشابه ریختی و مولکولی داشتند به صورتی‌که متعلق به جنس *Bacillus* بودند. نتایج شناسایی برای سایر جدایه‌ها نشان داد که Ba1: *Pantoea*، Ba2: *Pseudomonas*، Bio1: *Pseudomonas*، Bio2: *Acinetobacter*، N2: *Pseudomonas*، N3: *Citrobacter* و N4: *Pseudomonas* می‌باشند. دراین‌بین حضور جدایه N3: *Citrobacter* و Bio2: *Acinetobacter* در کود نیتروکسین و بیوسوپرفسفات مورد تأمل می‌باشد زیرا این باکتری‌ها در ترکیب این کودهای زیستی توسط تولیدکنندگان گزارش نشده است. گرچه بر اساس ادعای تولیدکنندگان کود زیستی نیتروکسین و سوپرنیتروپلاس به استفاده از دو باکتری *Azotobacter* و *Azospirillum* اشاره‌شده است اما نبود باکتری‌های فوق در این تحقیق مشخص شد.

واژه‌های کلیدی: بارور، شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی، کود زیستی، نیتروکسین، PGPR

Molecular and Biochemical Identification of the Bacterial Isolates Used in Common Biofertilizers in Iran

B khoshrou[1], MR Sarikhani[2], N Aliasgharzad[3]

Received: 7 December 2014 Accepted: 3 May 2015
[1]M.Sc. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran
[2,3]Assist. Prof. and Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Sci., Univ. of Tabriz, Iran
*Corresponding Author, Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

The benefits of biofertilizers in agriculture depend on the use of effective strains with desirable motivating plant growth characteristics. The quality control of the biofertilizers, especially in terms of investigating and proving the genus and species of the bacteria used in them is one of the most important criteria. Therefore, in this study, isolates of the four types of common nitrogen and phosphate biofertilizers in Iran, including Barvar2 (Ba1 and Ba2), Biosuperphosphate (Bio1, Bio2, Bio3 and Bio4), Supernitroplus (Sn1 and Sn2) and Nitroxin (N1, N2, N3, N4 and N5) were studied for the correctness at the genus and species levels. The molecular identification method was applied based on amplifying the 16S rDNA genes using universal primers 27F and 1492R. Also, the bacterial genus and species used in the biofertilizers were determined by proper biochemical tests. The results showed that the isolates N1, N5, Sn2 and Bio3 had a similar phenotype and all of them belonged to the *Pseudomonas* genus. Also, the Sn1 and Bio4 isolates had morphological and molecular similarities belonging to the *Bacillus* genus. The results of identification for the isolates Ba1, Ba2, Bio2, N2, N3 and N4 showed that they were *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* and *Pseudomonas*, respectively. Among the isolates, the presence of *Citrobacter* (N3) and *Acinetobacter* (Bio2) in the Nitroxin and Biosuperphosphate biofertilizers were noticeable, because they had not been reported by manufacturers in ingredient of the mentioned biofertilizers. However, contrary to the Nitroxin and Supernitroplus biofertilizers manufacturers' claim about using two isolates *Azotobacter* and *Azospirillum*, the present study indicated the lack of these bacteria in these biofertilizers.

Keywords: Barvar, Biofertilizer, Molecular and biochemical identification, Nitroxin, PGPR

مقدمه

افزایش تولید محصولات از چالش‌های اصلی کشاورزی است. استفاده بیش از حد کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها به‌منظور تولید بیشتر، سلامتی بشر و محیط‌زیست را به خطر می‌اندازد و به‌همین دلیل امروزه عملیات کشاورزی به‌سمت روش‌های پایدارتر و سازگار با محیط‌زیست سوق پیدا کرده است (لیچ و مومفورد ۲۰۰۸). بروز مشکلات اقتصادی و زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی و نیز توجه به قابلیت‌های ذاتی بسیار جالب و متنوع موجودات خاکزی و به‌ویژه ریزجانداران موجب گردیده که یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین زمینه‌های مورد تحقیق در مطالعات علمی روز، تلاش برای تولید کودهای زیستی باشد. کود زیستی یا بیولوژیک اصطلاحاً به مواد جامد یا مایعی اطلاق می‌شود که حاوی ریزجاندارانی است و هنگامی‌که بر روی بذر،

سطح ریشه و یا در خاک استفاده شود موجب تحریک و افزایش رشد گیاه شود (وسی ۲۰۰۳). 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 آفت کش‌ها را کاهش دهد (آدسموی و کلوپر ۲۰۰۹). تلاش برای جداسازی و به‌کارگیری PGPR [1]ها از اقداماتی است که به‌سرعت در حال گسترش بوده در تجاری‌سازی کودهای زیستی مشاهده می‌شود. باکتری‌های محرک رشد گیاه یا PGPR برای اولین بار برای باکتری‌های ریزوسفری متعلق به گروه سودوموناس‌های فلورسنت (گونه‌های *فلورسنس* و *پوتیدا*) وضع گردید (کلوپر و شروث ۱۹۷۸). امروزه این اصطلاح برای دیگر باکتری‌های خاک که در ریزوسفر گیاه به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به‌کار می‌رود. *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Azospirillum*، *Azotobcater* و *Rhizobium* از مهم‌ترین آن‌هاست (گلیک ۱۹۹۵، تیومرونگ و همکاران ۲۰۱۰). ریزجاندارانی که در تولید کودهای بیولوژیک مورداستفاده قرار می‌گیرند عمدتاً منشأ طبیعی دارند و از خاک جداسازی می‌شوند و در شرایط آزمایشگاه در محیط‌های کشت مخصوص تکثیر و پرورش پیدا می‌کنند، بعد به‌صورت مایع یا پودرهای جامد بسته‌بندی‌شده و مصرف می‌شوند (صالح‌راستین ۱۳۸۰).

کودهای زیستی نیتروژن، یکی از رایج‌ترین و پرمصرف‌ترین انواع کودهای زیستی بوده و گسترش زیادی یافته‌اند. از طرف دیگر با توجه به مشکلات ناشی از نتیجه‌بخش نبودن کودهای شیمیایی فسفره (در برخی موارد) و معضلات ناشی از کاربرد آن‌ها و مثبت بودن تأثیر کودهای زیستی فسفره در کشت گیاهانی مثل گندم و جو، این کودها موردتوجه واقع شده‌اند (زهیر و همکاران ۲۰۰۴). بااینکه هم‌اکنون کودهای زیستی فسفاته در مناطق محدودی استفاده می‌شوند ولی با توجه به نتایج به‌دست‌آمده پتانسیل رشد بسیار خوبی دارند. استفاده از کودهای زیستی و تقویت‌کننده‌های زیستی از قبیل باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و ریزموجودات مفید دیگر می‌تواند کاربرد کودهای شیمیایی را کاهش داده و در نتیجه هزینه تولید را پایین آورد. 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 از جمله دستاوردهای محققان در سال‌های اخیر است. بیوسوپر یا سوپرفسفات بیولوژیکی (سنگ فسفات به‌همراه گوگرد و باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد از جنس تیوباسیلوس‌ها) امروزه به‌عنوان کود زیستی فسفاته استفاده می‌شود. کود زیستی نیتروکسین حاوی باکتری‌های *سودوموناس*، *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم* است که برای تأمین نیتروژن موردنیاز گیاهان استفاده می‌شود (قربانی ۱۳۸۶). خوشبختانه در سال‌های اخیر در نتیجه تلاش محققان ایرانی برخی سویه‌های PGPR در قالب کودهای زیستی تولید و در کشاورزی مورداستفاده قرار گرفته است، اما ارزیابی آن‌ها به لحاظ کیفی با توجه به توضیحات فوق کمتر انجام شده است.

در مطالعه‌ای که بین سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ روی کودهای زیستی رایج در کشور اندونزی انجام گرفت. ۴۱ کود زیستی موردمطالعه قرار گرفت. در اغلب این کودها از دو یا تعداد بیشتری ریزجاندار استفاده شده بود و بیشترین فراوانی سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این نوع کودها متعلق به باکتری‌های جنس *Lactobacillus*، *Azotobacter*، *Bacillus* و *Rhizobium* بود. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که این کودها دارای توان حل‌کنندگی فسفات و تثبیت نیتروژن می‌باشند و از میان کودهای زیستی مذکور، ۵ کود دارای جمعیت میکروبی فعال کمتری نسبت به مشخصات قیدشده در ویژگی‌های مربوط به کود بودند. همچنین در این تحقیق مقادیر عناصر N، P و K در برخی از این کودها معادل کودهای آلی یا حتی بیشتر از آن‌ها گزارش شد. نتایج حاصله از

[1] Plant growth-promoting rhizobacteria

کشت میکروبی نیز مشخص کرد که ۳ کود زیستی دارای جمعیت کمتر از 10^3 cfu/ml بودند و تنها یک نوع کود زیستی تلفیقی مطابق با استانداردهای رایج، دارای جمعیت میکروبی بیشتر از 10^7 cfu/g بود. نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های حل‌کنندگی فسفات و تولید اکسین توسط این نوع کودها نیز حاکی از این بود که تنها یک نوع کود زیستی مایع و آن‌هم از نوع چند سویه‌ای قادر به سنتز اکسین توسط باکتری *Azospirillum lipoferum* در محیط نمک‌های معدنی در کمترین حالت حاوی ال-تریپتوفان بود (هوسن و همکاران ۲۰۰۷).

به‌هرحال بهره‌مندی از منافع ناشی از کودهای زیستی زمانی حاصل خواهد شد که کیفیت لازم در تهیه زادمایه این کودها به‌کار گرفته شود (دیکر و همکاران ۲۰۱۱). استفاده از کودهای زیستی همواره اثربخش نبوده و در مواردی انتظارات لازم را برآورده نمی‌سازد، صرف‌نظر از سایر عوامل تأثیرگذار در این امر یکی از عوامل عمده و مهم، کیفیت کود زیستی هست. تأیید جدایه‌های به‌کاررفته در کودهای زیستی یکی از جنبه‌های کنترل کیفیت آن‌ها به شمار می‌رود. بدین خاطر ضرورت آن احساس می‌شود که در مطالعه‌ای به شناسایی و تأیید سویه‌های بکار رفته در کودهای زیستی کشور پرداخت. خاطرنشان می‌شود که بهره‌گیری از کودهای زیستی در کشاورزی و مشاهده اثرات مثبت آن‌ها منوط به رعایت جنبه‌های کیفی این کودها و استفاده از سویه‌های مؤثر با توجه به ویژگی PGPR آن‌هاست. بر این اساس در این پژوهش باکتری‌های مورداستفاده در چهار نوع کود زیستی رایج کشور شامل بارور۲، بیوسوپرفسفات، نیتروکسین و سوپرنیتروپلاس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

تهیه و جداسازی جدایه‌های باکتریایی مورداستفاده در کود زیستی

در این تحقیق 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 فنآور سبز، به‌صورت جامد) انتخاب و موردبررسی قرار گرفت. بر اساس ادعای تولیدکنندگان در این کودها به‌ترتیب از باکتری‌ها زیر استفاده شده است؛ بارور۲ (*Pseudomonas putida* و *Pantoea agglomerans*)، بیوسوپرفسفات (*Pseudomonas* sp. و *Bacillus* sp.)، نیتروکسین (*Azotobacter* sp. و *Azospirillum* sp.) و سوپرنیتروپلاس (*Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens* و *Azospirillum* sp.)، و اطلاعات دیگر در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- اطلاعات قیدشده از طرف تولیدکنندگان کودهای زیستی بر روی بسته کود در این تحقیق.

کود	جنس و گونه باکتری	برخی ویژگی‌ها	تاریخ اعتبار
بیوسوپر فسفات	*Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp.	10^7 کلنی باکتری برای هر یک از جنس‌های باکتری در هر میلی‌لیتر کود	۹۱/۱۲/۱۰-۹۲/۶/۱۰
بارور۲	*Pantoea agglomerans* *Pseudomonas putida*	بهبود ساختمان خاک، کاهش بیماری‌های خاکزاد و افزایش محصول	۹۲/۷/۸ (سری تولید ۵۴۰c)
نیتروکسین	*Azospirillum* sp. *Azotobacter* sp.	10^8 کلنی برای هر یک از جنس‌های باکتری در هر میلی‌لیتر از کود	۹۲/۸/۸-۹۱/۱۲/۸
سوپرنیترو پلاس	*Bacillus subtilis,* *Pseudomonas* sp. *Azospirillum* sp.	10^7 باکتری تثبیت‌کننده ازت و محرک رشد در هر میلی‌لیتر کود و 10^8 اسپور و سلول زنده *Bacillus*	۹۲/۴/۱۰-۹۱/۱۰/۱۹

به‌منظور جداسازی باکتری‌های 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 LB [۲] 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 هست (موتسارا و روی ۲۰۰۸). 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 رنگ-آمیزی گرم (دیکر و همکاران ۲۰۱۱) برای تأیید حضور جنس‌های مورد ادعا انجام گرفت.

شناسایی مولکولی

برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها به‌روش 16S rRNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R خریداری‌شده از شرکت ژن فن‌آوران استفاده شد (جدول ۲). برنامه PCR به‌کاررفته دارای ۳۰ چرخه بود که در دستگاه ترموسایکلر Flexigene این چرخه‌ها شامل، یک چرخه نخستین با دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۴ دقیقه، در پی آن دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، دمای ۵۳ درجه سلسیوس (دمای پیوند آغازگر) برای ۱ دقیقه و دمای فراوان شدن ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه بود که در پایان یک چرخه اضافی دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه نیز انجام شد. یادآور می‌شود که برای انجام PCR از تک کلنی باکتری‌ها بهره‌گیری شد و بدین گونه از استخراج DNA ژنومی باکتری چشم‌پوشی شد. ابتدا ۳۰ میکرو لیتر آب دیونیزه استریل را داخل تیوب ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته سپس لوپ مستقیم استریل شده در شعله را به کلنی تماس داده و به داخل آب انتقال داده، سپس به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شد تا DNA باکتری در محلول آزاد شود. با فراهم نمودن سایر اجزاء PCR تنها ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون حاوی DNA به آن انتقال داده شد. نوارهای پدیدارشده (نزدیک ۱۵۰۰ جفت باز) پس از ران شدن محصول PCR بر روی ژل آگاروز و اطمینان از تکثیر باند موردنظر بقیه DNA تکثیرشده از قطعه رمز کننده 16S rRNA جهت توالی‌یابی مورداستفاده قرار گرفت. پس از توالی‌یابی نمونه‌ها، توالی‌های موردنظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI[۳]، BLAST-n[۴] شدند و به بررسی یافته‌های آن‌ها پرداخته شد.

جدول ۲- آغازگرهای عمومی برای تکثیر بخش 16S rDNA باکتری‌ها.

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای پیوند
27F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	T_m:53
1492R	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'	

برخی از ویژگی‌های شکل‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌ها به کمک رنگ‌آمیزی گِرم و تست‌های اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، سیترات، حرکت، ایندول، تولید سولفیدهیدروژن، تجزیه گلوکز، ساکارز، لاکتوز و غیره موردبررسی قرار گرفتند، که به برخی از تست‌های بیوشیمیایی مهم اشاره می‌شود.

تست‌های بیوشیمیایی

تست اکسیداز

برای انجام این آزمون ابتدا یک کشت تازه از باکتری‌ها را روی محیط‌های غیر رنگی همانند NA تهیه و سپس با خلال‌دندان استریل، کلنی باکتری به کاغذ آغشته به معرف اکسیداز (تترا متیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید) انتقال داده می‌شود، اگر در طی این تماس رنگ آبی تشکیل شود به معنی وجود آنزیم سیتوکروم اکسیداز است. یادآور می‌شود که در انتقال

[2] Luria and Bertani

[۳] National center for biotechnological information

[۴] Basic local alignment search tool (for Nucleotide)

کلنی از سیم کشت (لوپ) نباید استفاده کرد چرا که لوپ فلزی به‌دلیل تشکیل اکسید آهن می‌تواند جواب مثبت کاذب[5] ایجاد نماید.

تست نیترات

برای انجام این آزمون، محیط کشت حاوی ۱۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم نیترات پتاسیم در یک لیتر آب تهیه و در حجم‌های ۵ میلی‌لیتر در داخل لوله‌های آزمایش اتوکلاو گردید. پس از کشت باکتری در لوله‌های آزمایش و انکوباسیون ۲۴-۴۸ ساعته آن، به لوله‌های حاوی باکتری به‌ترتیب ۵ قطره محلول A (۸ گرم سولفانیلیک اسید و ۴۸ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ با آب دیونیزه به حجم یک لیتر رسانده شد) و ۵ قطره محلول B (۵ گرم آلفا- نفتیل آمین و ۸ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ با آب دیونیزه به حجم یک لیتر رسانده شد) اضافه گردید. مشاهده رنگ ارغوانی در لوله‌ها، نشانگر وجود فعالیت آنزیم نیترات‌رداکتاز در باکتری‌های مورد بررسی است. عدم مشاهده رنگ ارغوانی در محیط کشت می‌تواند به‌دلیل عدم احیاء نیترات و یا تبدیل نیترات به مشتقات دیگر باشد. در تائید عدم احیای نیترات به نیتریت، مقدار بسیار جزئی پودر روی (Zn) به لوله‌های فوق اضافه شد. تغییر رنگ محیط به رنگ ارغوانی گواه فقدان آنزیم احیای نیترات در باکتری‌های مورد مطالعه است. اما اگر چنانچه باز تغییر رنگ در محیط کشت مشاهده نشود، این امر می‌تواند به این سبب باشد که نیترات به نیتریت، و دیگر اشکال گازی نیتروژن یا گاز نیتروژن (دِنیتریفیکاسیون) تبدیل شده است (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

تست سیترات

برای این آزمون از محیط Simmons Citrate Agar استفاده شد که هر لیتر آن شامل ۰/۲ گرم سولفات منیزیم (به‌عنوان کوفاکتور)، ۱ گرم فسفات آمونیوم (منبع نیتروژن و فسفر)، ۱ گرم دی سدیک فسفات (بافر)، ۲ گرم سیترات سدیم (منبع کربن)، ۵ گرم سدیم کلرید (تعادل اسمزی محیط)، ۱۵ گرم آگار (جامدکننده) و ۰/۰۸ گرم برموتیمول‌بلو (شاخص تغییر pH) است. بعد از اتوکلاو شدن مقدار ۳-۵ میلی‌لیتر از محیط را به‌صورت مورب تهیه و سپس از کشت تازه باکتریایی روی سطح شیب‌دار به‌صورت زیگزاگی کشت شد و بعد از مدت ۴۸- ۲۴ ساعت اگر رنگ آبی ظاهر شد گواه وجود آنزیم سیتراتاز است (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

تست اوره آز

در انجام این آزمون از محیط کشتی استفاده شد که هر لیتر آن حاوی ۱ گرم گلوکز، ۱ گرم پپتون، ۲ گرم KH_2PO_4، 5 گرم سدیم کلرید، ۱۵ گرم آگار و ۰/۰۱۲ گرم محلول فنل‌رد بود و پس از اتوکلاو شدن به‌صورت شیب‌دار به مقدار ۵-۳ میلی‌لیتر از محیط کشت تهیه شد. سپس تلقیح میکروبی از کشت تازه باکتری‌ها به‌صورت زیگزاگ در سطح شیب‌دار انجام گرفت و بعد از مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون اگر رنگ قرمز ظاهر شد باکتری دارای آنزیم اوره‌آز است و محیط را قلیایی کرده است و در صورت عدم رنگ قرمز و باقی ماندن رنگ زرد باکتری فاقد آنزیم اوره‌آز است (شاد و همکاران ۲۰۰۱). توجه شود که در نتیجه انکوباسیون طولانی‌مدت و هیدرولیز پروتئین موجود در پپتون نتایج مثبت کاذب حاصل خواهد شد.

تست نشاسته

به محیط کشت نوترینت آگار، مقدار ۰/۲ درصد نشاسته محلول در آب اضافه شد و پس از اتوکلاو، در پتری‌های استریل توزیع گردید. پس از کشت نقطه‌ای و انکوباسیون باکتری‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت، مقداری محلول لوگول (۲۰ گرم ید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد) به سطح هر پتری کشت افزوده شد. درصورتی‌که در زمینه آبی محیط کشت‌ها، هاله‌های روشن در اطراف کشت باکتری‌ها مشاهده گردد، این مؤید فعالیت آنزیمی آلفا آمیلازی باکتری‌ها هست (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

تست قندها

باکتری‌ها از منابع قندی (کربوهیدرات‌ها) یا آمینواسیدهای مختلف می‌توانند استفاده نمایند که در اثر مصرف قندها محیط اسیدی می‌شود و با بهره‌گیری

[5] False positive

از معرف‌های فنل‌رد و برموتیمول‌بلو اسیدی شدن محیط قابل‌تشخیص است. در انجام این آزمون از محیط کشت آب پپتون که شامل ۲ گرم پپتون، ۰/۵ گرم سدیم کلرید، ۲-۱ میلی‌لیتر برموتیمول‌بلو یا فنل‌رد و قند موردنظر به مقدار ۱٪ هست استفاده شد، بعد از تهیه و استریل محیط، ۵-۳ میلی‌لیتر از محیط را در لوله‌های آزمایش ریخته و برای تلقیح از کشت تازه باکتریایی استفاده می‌شود که بعد از مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون اگر قند مصرف و در نتیجه آن محیط اسیدی شود، محیط به رنگ زرد نمایان می‌شود (شاد و همکاران ۲۰۰۱). از قندهای گلوکز، لاکتوز، مالتوز، ساکارز و گلیسرول در این آزمون استفاده شد.

تست ویژگی فلورسنتی

در انجام این آزمون از محیط کشت King B استفاده شد که هر لیتر آن شامل ۲۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم گلیسرول، ۱/۵ گرم K_2HPO_4، ۱/۵ گرم سولفات منیزیم و ۱۰ گرم آگار است. بعد از اتوکلاو شدن محیط آن را در پلیت ریخته و باکتری‌های موردنظر روی آن کشت شدند و بعد از رشد باکتری‌ها با تابش اشعه UV می‌توان خاصیت فلورسنتی را با مشاهده رنگ سبز-آبی مشخص نمود.

تست ژلاتیناز

ابتدا در لوله‌های آزمایش ۵-۳ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی ۵ گرم پپتون و ۳ گرم عصاره گوشت و ۱۲۰ گرم ژلاتین ریخته و سپس از کشت شبانه باکتری‌ها با لوپ برداشته و در داخل محیط کشت جامد فرو برده شد. انکوباسیون در دمای ۲۵-۲۲ درجه سلسیوس و به‌مدت ۲-۱ هفته انجام شد. پس از اتمام انکوباسیون اگر محیط آبکی شد، باکتری دارای آنزیم ژلاتیناز است و اگر بدون تغییر ماند، باکتری فاقد آنزیم ژلاتیناز است. البته می‌توان قبل از بررسی نتیجه ابتدا لوله‌ها را به‌مدت ۳۰ دقیقه در یخچال نگهداری نمود و سپس اقدام به مشاهده کرد (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

تست ایندول

ایندول یک ترکیب آلی ناجورحلقه آروماتیکی است که به‌وسیله برخی از باکتری‌ها در نتیجه تجزیه آمینواسید تریپتوفان حاصل می‌شود که طی این واکنش ایندول و پیروات و آمونیوم تولید می‌شود. ساده‌ترین محیط کشت آب پپتون است چون پپتون غنی از تریپتوفان است. این محیط شامل ۱۰ گرم پپتون و ۵ گرم سدیم کلرید هست. از محیط آب پپتون بعد از اتوکلاو شدن به مقدار ۵-۳ میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش ریخته و به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون انجام شد. بعد از طی مدت انکوباسیون ۰/۵-۰/۲ میلی‌لیتر از معرف Kovacs یا بنزالدئید (۴/۸٪ Dimethyl amino benzaldehyde، ۷۱/۴٪ Isoamylalchol، ۲۳/۸٪ Hydrochloric Acid) به لوله‌ها اضافه و اگر لایه قرمز آلبالوئی در سطح تشکیل شود دلیل بر حضور آنزیم تریپتوفاناز است (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

اگر مدت انکوباسیون طولانی (۴- ۵ روز) شود شاید به‌دلیل تجزیه ایندول جواب منفی کاذب حاصل شود.

تست تریپتوفان

همانند برخی از قندها، باکتری‌ها از برخی آمینواسیدها نیز می‌توانند استفاده نمایند. آمینواسیدهای مختلفی در تست‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد که ترکیباتی نظیر تریپتوفان، آرژینین، لیزین، لوسین، پرولین و غیره از این نمونه هستند. در استفاده از این اسیدهای آمینه آنزیم‌هایی درگیرند که آمین‌زدایی از آن‌ها منجر به تشکیل آمونیم شده و افزایش pH را به دنبال خواهد داشت. در انجام تست آمینواسید خاص، معمولاً از معرف فِنل‌رد استفاده می‌شود که در محیط قلیایی به رنگ قرمز درمی‌آید. برای این آزمون از محیط Thornley S استفاده می‌شود که شامل ۱ گرم پپتون، ۵ گرم سدیم کلرید، ۰/۳ گرم K_2HPO_4، 3 گرم آگار، ۰/۰۱ گرم فنل‌رد (pH= ۷/۲) و ۱۰-۵ گرم ال-تریپتوفان در لیتر است. بعد از اتوکلاو شدن مقدار ۵-۳ میلی‌لیتر از محیط که به‌صورت نیمه جامد تهیه و سپس از کشت تازه باکتریایی تلقیح میکروبی انجام می‌گیرد و بعد از

مدت ۳ روز اگر رنگ قرمز ظاهر شد مؤید وجود آنزیم تریپتوفاناز است (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

تست آرژینین

آرژینین اسیدآمینه‌ای است که مورد استفاده باکتری‌ها قرار می‌گیرد و آنزیم آرژیناز یا آرژینین دِآمیناز در تجزیه آن نقش دارد. آمین‌زدایی این اسیدآمینه منجر به تشکیل آمونیوم شده که باعث افزایش pH می‌شود. برای این آزمون از محیط Thornley S استفاده می‌شود که شامل ۱ گرم پپتون، ۵ گرم سدیم کلرید، ۰/۳ گرم K_2HPO_4، 3 گرم آگار، ۰/۰۱ گرم فنل رد و ۱۰-۵ گرم ال-آرژینین در لیتر است. بعد از اتوکلاو شدن مقدار ۵-۳ میلی‌لیتر از محیط که به‌صورت نیمه جامد تهیه و سپس از کشت تازه باکتریایی تلقیح میکروبی انجام می‌گیرد و بعد از مدت ۳ روز اگر رنگ قرمز ظاهر شد مؤید وجود آنزیم آرژیناز است (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

تست تولید سولفید هیدروژن

در انجام این آزمون از محیط کشت حاوی ۲۰ گرم کازئین، ۶ گرم بافت‌های جانوری (مخمر)، ۰/۲ گرم تیوسولفات سدیم، ۰/۲ گرم فروآمونیوم سولفات (یا سولفات آهن) و ۳/۵ گرم آگار استفاده و بعد از اتوکلاو شدن به مقدار ۵-۳ میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش ریخته شد. سپس از کشت تازه باکتریایی به محیط اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شد. اگر بعد از مدت انکوباسیون رنگ تیره ظاهر شود یعنی باکتری توانایی تولید سولفید هیدروژن را دارد (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

نتایج و بحث

جداسازی باکتری‌ها و شناسایی مقدماتی و بیوشیمیایی

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها از ۴ نوع کود زیستی رایج در کشور شامل نیتروکسین، سوپرنیتروپلاس، بیوسوپرفسفات (تولیدی شرکت فناوری زیستی مهر آسیا) و بارور۲ (تولیدشده در شرکت زیست فن‌آور سبز) منجر به جداسازی ۱۳ جدایه بر اساس ریخت و ظاهر شد. آزمایش‌های اولیه نشان داد که به‌جز دو جدایه Sn1 و Bio4 که گِرم مثبت هستند بقیه باکتری‌ها (۱۱ جدایه) گرم منفی می‌باشند و برخی از آن‌ها اکسیداز منفی و مثبت، بعلاوه تعدادی دارای توان ساخت رنگ‌دانه در محیط king-B می‌باشند.

نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی ۱۳ ایزوله در جدول ۳ آورده شده است.

تست اکسیداز

این تست باکتری‌های دارای آنزیم سیتوکروم اکسیداز (هوازی) و فاقد این آنزیم (بی‌هوازی‌های اختیاری) را از هم تفکیک می‌نماید. برخی از باکتری‌ها نظیر *سودموناس* و دیگر باکتری‌ها دارای آنزیم سیتوکروم در غشای خود هستند که در زنجیره انتقال الکترون دخالت دارند.

با توجه به‌وجود این آنزیم در اکثر گونه‌های جنس *Pseudomonas* و عدم وجود این آنزیم در جنس *Stenotrophomonas* به‌نظر شباهت دو جدایه Sn2 و Bio3 با جنس‌های فوق که در جدول ۴ قیدشده، منتفی است و این دو جدایه متعلق به جنس *Pseudomonas* می‌باشند (گریتی ۲۰۰۵). در این آزمایش سویه‌های N1، N2، N5، Sn2، Ba2، Bio3 و Bio1 مثبت و بقیه منفی شدند (جدول ۳).

تست نیترات

احیای نیترات (NO_3^-) به نیتریت (NO_2^-) و در نهایت به گاز نیتروژن (N_2) توسط برخی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری صورت می‌پذیرد. به‌دلیل سمی بودن نیتریت، باکتری‌های مولد، آن را به‌سرعت تبدیل به N_2O و یا گاز N_2 می‌نمایند که به این مرحله دِ نیتریفیکاسیون یا تنفس نیتراتی گفته می‌شود.

بر اساس راهنمای برگِی[6] گونه‌های شناخته‌شده جنس *Psuedomonas* شامل *P. fluorescens* و *P. putida* یا *P. aeruginosa* از نظر احیاء نیترات به‌ترتیب دارای ویژگی متغیر، منفی و مثبت هستند (گریتی ۲۰۰۵) با این شرح با در نظر گرفتن نتایج جدول ۳ تشابه باکتری‌های N1، N5، Sn2 و Bio3 با دو گونه *P. fluorescens* و *P. aeruginosa* قوت می‌یابد. در این

[6] Bergeys manual

آزمایش سویه‌های N1، N2، N3، N5، Sn1، Sn2، Ba1، Bio3 و Bio4 مثبت و بقیه منفی شدند (جدول ۳).

تست سیترات

برخی از باکتری‌ها با داشتن آنزیم سیتراتاز، سیترات را به اسیدهای ضعیفی نظیر اسید سیتریک و اگزالیک تبدیل و این اسیدها در سیکل کربن به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌شوند و طی این سیکل دی‌اکسیدکربن تولیدشده و در ترکیب با سدیم تولید کربنات سدیم و بی‌کربنات سدیم نموده و محیط را قلیایی و باعث ایجاد رنگ آبی می‌شود که دلیلی بر تجزیه سیترات است. در این آزمایش سویه‌های N1، N2، N3، N5، Sn2، Ba1، Ba2، Ba2، Bio1، Bio2 و Bio3 مثبت و جدایه‌های N4، Sn1 و Bio4 منفی شدند (جدول ۳).

تست اوره‌آز و نشاسته

اوره‌آز آنزیمی است که در هیدرولیز اوره نقش ایفا می‌کند. اوره توسط این آنزیم مطابق واکنش زیر هیدرولیز می‌شود.

$$CO(NH2)2 + 2H2O \xrightarrow{\text{اوره‌آز}} (NH_4)_2CO_3 \rightarrow CO_2 + 2NH_3 + H_2O$$

در نتیجه تولید آمونیاک و تشکیل هیدروکسیدآمونیوم محیط بازی خواهد شد. اگر در این شرایط از معرف‌های حساس به تغییرات pH مثل فنل‌رد، برموتیمول‌بلو استفاده شود می‌توان پی به تجزیه اوره برد. در این آزمایش جدایه‌های N1، N3، N5، Sn1، Sn2، Bio1، Bio3 و Bio4 مثبت و بقیه منفی شدند (جدول ۳).

در آزمایش هیدرولیز نشاسته سویه‌های Sn1 و Bio4 مثبت و بقیه منفی شدند (جدول ۳).

تست ویژگی فلورسنتی

برخی از باکتری‌ها دارای ویژگی فلورسنتی هستند بدین معنی که طول‌موج‌های کوتاه را به‌صورت موج‌های بلند ساطع می‌کنند. به‌عنوان‌مثال باکتری‌های *سودوموناس* به دو گروه فلورسنت (*P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida*) و غیرفلورسنت (*P. stutzeri*) تقسیم‌بندی می‌شوند، گرچه برخی از سویه‌های *سودوموناس پوتیدا* از نظر ویژگی فلورسنتی متغیر هستند (گریتی ۲۰۰۵). از شاخص‌ترین رنگدانه‌های فلورسنتی پایووردین هست که در ۳ باکتری فوق‌الذکر تولید می‌شود که به‌صورت زرد- سبز هست و بعد از رشد باکتری در محیط King B وقتی در معرض نور UV با طول‌موج کوتاه (254nm) قرار می‌گیرد ویژگی فلورسنتی از خود نشان می‌دهد. در این آزمون، سویه‌های N1، N2، N5، Sn2 و Bio3 خاصیت فلورسنتی از خود نشان دادند (مثبت) و بقیه منفی شدند (جدول ۳).

تست ژلاتیناز

ژلاتین یک منبع پروتئینه و عامل جامدکننده محیط‌های کشت آزمایشگاهی است که البته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس ذوب می‌شود. این ترکیب به‌دلیل اندازه بزرگ مولکول قادر به عبور از دیواره سلول باکتری‌ها نیست، پس باکتری‌ها برای استفاده از آن بایستی آنزیم برون سلولی ژلاتیناز ترشح نمایند و در صورت وجود این آنزیم ژلاتین هیدرولیز خواهد شد و ویژگی جامدکنندگی خود را از دست می‌دهد یا به عبارتی آبکی می‌شود. در این آزمون سویه‌های N1، N2، N4، N5، Sn1، Sn2، Ba2، Bio3 و Bio4 مثبت و بقیه منفی شدند (جدول ۳).

تست تریپتوفان و آرژینین

نتیجه نمونه‌ای از تست‌های آمینواسیدها از جمله تریپتوفان و آرژینین نیز در جدول ۳ آورده شده است.

تست تولید سولفید هیدروژن

برخی از باکتری‌ها دارای آنزیم‌هایی هستند که قابلیت تجزیه آمنیواسیدهای گوگرددار نظیر سیستئین، سیستین و متیونین را دارند، به‌دلیل وجود گروه‌های سولفیدریل در این ترکیبات و در نتیجه تخریب این گروه‌ها، سولفید هیدروژن تولید می‌شود. استفاده از ترکیبات آهن در چنین محیط‌هایی منجر به تشکیل سولفید آهن (رنگ تیره) می‌شود که مشخصه تولید سولفید هیدروژن است. در این آزمون فقط جدایه‌های N3 و Ba1 مثبت و بقیه منفی شدند (جدول ۳).

تست گلوکز و ساکاروز

در نتیجه انجام این تست جدایه‌های مثبت منجر به پیدایش رنگ زرد شده و جدایه منفی به رنگ سبز باقی می‌مانند. در آزمون گلوکز سویه‌های N1، N2، N3، N5، Sn2، Ba1، Bio1 و Bio3 مثبت و بقیه منفی شدند و در آزمون ساکاروز تنها سویه‌های N3 و Ba1 مثبت و بقیه منفی شدند (جدول ۳).

شناسایی مولکولی باکتری‌ها

شناسایی مولکولی به‌روش توالی‌یابی ژن رمزکننده 16S rRNA انجام پذیرفت که در شکل ۱ نمونه‌ای از محصول PCR مربوط به تکثیر ژن رمزکننده این قطعه آورده شده است. اطلاعات مربوط به باکتری‌های شناسایی‌شده در این تحقیق در جدول ۴ آورده شده است.

شناسایی مولکولی جدایه‌های N2، N4 و Ba2 انجام نشده است، اما با بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی آن‌ها (جدول ۳) تشابه N2 با جدایه‌های N1، N5، Sn2 و Bio3 مشخص می‌شود و دو جدایه N4 و Ba2 به‌جز در تست‌های اکسیداز، لیزین و سیترات در بقیه ویژگی‌ها تشابه بالایی به هم دارند. با نگاهی به راهنمای بِرگی و ملاحظه ویژگی‌های سه گونه *P. putida*، *P.aeruginosa* و *P. fluorescens* و همچنین در نظر داشتن بیشترین تشابه توالی rDNA آن‌ها، تشابه باکتری‌های N1، N5، Sn2، Bio3 و N2 به گونه *P. aeruginosa* قوت می‌یابد.

به‌نظر باکتری‌های N4 و Ba2 متعلق به گونه *P. putida* باشند. پاسخ‌های نیترات منفی، اوره‌آز منفی، عدم تولید فلئورسنت از جمله دلایل مهم در عدم قرارگیری این دو باکتری در گونه‌های *P.aeruginosa* و *P. fluorescens* می‌تواند باشد (گریتی ۲۰۰۵).

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها

توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی به‌صورت جداگانه نیز در مورد ۱۳ جدایه به‌دست‌آمده از کودهای زیستی انجام پذیرفت. بهره‌گیری از راهنمای بِرگی و همچنین مراجعه به وب‌سایت ABIS Encyclopedia قابل‌دسترسی در آدرس http://www.tgw1916.net/bacteria_abis.html نتایج مطابق با جدول ۵ را به دنبال داشت. همان‌طور که از مطابقت جداول ۴ و ۵ قابل‌مشاهده است نتایج شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی جدایه‌ها همپوشانی بالایی را با هم نشان می‌دهند.

جدایه N2 گرچه از نظر فنوتیپ بویژه تشکیل رنگدانه قهوه‌ای در محیط NA با سایر جدایه‌ها یعنی N1، N5، Sn2 و Bio3 تشابهی نداشت اما در تست‌های بیوشیمیایی بیشترین تشابه را با آن‌ها داشت و تنها تفاوت این جدایه عدم وجود آنزیم اوره‌آز و مانیتول منفی بودن آن در مقایسه با ۴ جدایه دیگر بود (جدول ۳). در تحقیقات به تشکیل رنگدانه قهوه‌ای در جداسازی و شناسایی برخی از باکتری‌ها از جمله باکتری‌های *ازتوباکتر* توجه خاصی صورت می‌گیرد اما، به تولید رنگدانه قهوه‌ای تیره در نتیجه وجود مقادیر فراوان سیتوکروم c در برخی از گونه‌های جنس *سودوموناس* نیز اشاره شده است (گریتی ۲۰۰۵). تشکیل چنین رنگدانه‌های در کشت برخی از باکتری‌های این آزمایش می‌تواند به‌دلیل فوق باشد.

با نگاهی به راهنمای بِرگی و ملاحظه ویژگی‌های بیوشیمیایی جنس *Pseudomonas* و همچنین در نظر داشتن بیشترین تشابه توالی rRNA آن‌ها، تشابه باکتری‌های N1، N5، Sn2، Bio3 و N2 به گونه *P. aeruginosa* قوت می‌یابد. علاوه بر آن دو جدایه N4 و Ba2 از نظر تست‌های بیوشیمیایی بیشترین تشابه را داشتند و این موضوع قرابت این دو باکتری را به هم نشان می‌دهد و به‌نظر باکتری‌های N4 و Ba2 متعلق به جنس *Pseudomonas* sp. باشند.

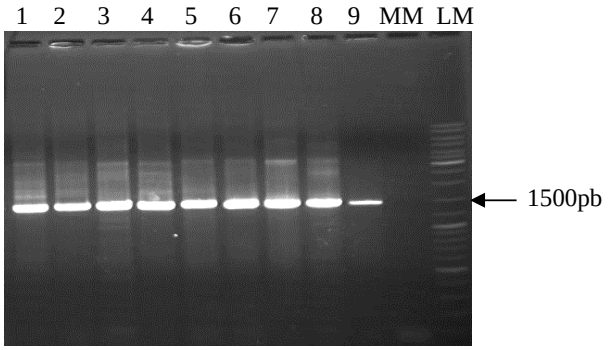
نتیجه‌گیری کلی

نخستین گام در بهره گرفتن از کودهای زیستی وجود سویه‌های کارآمد و برتر در آن‌ها هست. در این پژوهش ۱۳ جدایه باکتری بر اساس ریخت و شکل در چهار کود زیستی جداسازی و خالص‌سازی شد. شناسایی باکتری‌ها به‌روش مولکولی و تست‌های بیوشیمیایی تکمیلی نشان داد که عمدتاً از گروه باکتری‌های گرم منفی هستند و تنوع جنسی در آن‌ها دیده می‌شود. این آزمایش با هدف تأیید جنس و گونه

جدایه‌های به‌دست‌آمده از کودهای زیستی انجام شد و جدایه‌های به‌دست‌آمده از کودهای زیستی برای بارور۲ (Ba1 و Ba2)، بیوسوپرفسفات (Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4)، سوپرنیتروپلاس (Sn1 و Sn2) و نیتروکسین (N1، N2، N3، N4 و N5) به‌ترتیب دو، چهار، دو و پنج جدایه بود. نتایج نشان داد که جدایه‌های N1، N5، Sn2 و Bio3 از نظر فنوتیپ مشابه و همگی متعلق به جنس *Pseudomonas* بودند همچنین جدایه‌های Sn1 و Bio4 نیز تشابه ریختی و مولکولی داشتند و متعلق به جنس *Bacillus* بودند. نتایج شناسایی برای سایر جدایه‌ها نشان داد که Ba1: *Pantoea*، Ba2: *Pseudomonas*، Bio1: *Pseudomonas*، Bio2: *Acinetobacter*، N2: *Pseudomonas*، N3: *Citrobacter* و N4: *Pseudomonas* می‌باشند. دراین‌بین حضور جدایه N3: *Citrobacter* و Bio2: *Acinetobacter* در کود نیتروکسین و بیوسوپرفسفات مورد تأمل هست که دلیلی بر عدم شناسایی صحیح باکتری توسط تولیدکنندگان آن یا وجود آلودگی میکروبی در فرایند تولید و عرضه کود است. گرچه بر اساس ادعای تولیدکنندگان کود زیستی نیتروکسین و سوپرنیتروپلاس به استفاده از دو باکتری *Azotobacter* و *Azospirillum* اشاره شده است اما عدم حضور باکتری‌های فوق در این تحقیق مشخص شد.

جدول ۳- نتایج تست‌های بیوشیمیایی.

نام ایزوله	Bio4	Bio3	Bio2	Bio1	Ba2	Ba1	Sn2	Sn1	N5	N4	N3	N2	N1
اکسیداز	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
نیترات	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
سیترات	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
اوره	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
نشاسته	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ژلاتین	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
گلوکز	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
گلیسرول	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
لاکتوز	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
ساکاروز	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
مانیتول	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
فلورسنت	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
تریپتوفان	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ایندول	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
آرژینین	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
لیزین	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
پرولین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سولفید	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-



شکل ۱- محصول PCR به‌دست‌آمده تکثیر ژن رمزکننده 16S rRNA. نردبان مولکولی با اندازه بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز (LM)، محلول دارای تمام اجزاء واکنش به‌جز DNA باکتریایی (MM) و نمونه‌های باکتری با نام‌گذاری 1-9.

جدول۴- نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های میکروبی بکار رفته در کودهای زیستی.

کود زیستی	ایزوله	بیشترین تشابه به‌دست‌آمده از NCBI
نیتروکسین	N1	*Pseudomonas aeruginosa* / *Pseudomonas* sp.
	N2	
	N3	*Citrobacter* sp.
	N4	
	N5	*Pseudomonas* sp. / *Pseudomonas aeruginosa*
سوپرنیتروپلاس	Sn1	*Bacillus* sp.
	Sn2	*Stenotrophomonas* sp. / *Pseudomonas* sp.
بیوسوپرفسفات	Bio1	*Pseudomonas* sp.
	Bio2	*Acinetobacter* sp. / *Acinetobacter beijerinckii*
	Bio3	*Pseudomonas* sp. / *Stenotrophomonas* sp.
	Bio4	*Bacillus* sp.
بارور۲	Ba1	*Pantoea* sp.
	Ba2	

*: لازم به توضیح است که در مورد جدایه‌های بدون ذکر مشخصات، شناسایی مولکولی آن‌ها انجام نگرفته اما شناسایی بیوشیمیایی در جدول ۵ قابل‌مشاهده هست.

جدول۵- نتایج شناسایی بیوشیمیایی سویه‌های میکروبی بکار رفته در کودهای زیستی.

کود زیستی	جدایه	نتیجه سایت ABIS Encyclopedia
نیتروکسین	N1	*Pseudomonas* sp. / *Pseudomonas aeruginosa*
	N2	*Pseudomonas* sp. / *Pseudomonas fluorescens*
	N3	*Citrobacter* sp. / *C. freundii*
	N4	*Pseudomonas* sp. / *Acinetobacter* sp.
	N5	*Pseudomonas* sp. / *Pseudomonas aeruginosa*
سوپرنیتروپلاس	Sn1	*Bacillus* sp. / *Bacillus firmus*
	Sn2	*Pseudomonas* sp. / *Pseudomonas aeruginosa*
بیوسوپرفسفات	Bio1	*Pseudomonas* sp. / *Pseudomonas fragi* / *Pseudomonas mendocina*
	Bio2	*Acinetobacter sp.* / *A. johnsonii*
	Bio3	*Pseudomonas* sp. / *Pseudomonas aeruginosa*
	Bio4	*Bacillus* sp. / *Bacillus firmus*
بارور۲	Ba1	*Pantoea agglomerans*
	Ba2	*Pseudomonas* sp. / *Acinetobacter* sp.

منابع مورد استفاده

کوچکی ع ر، تبریزی ل و قربانی ر، ۱۳۸۷. ارزیابی اثر کودهای بیولوژیکی بر ویژگی‌های رشد، عملکرد و خصوصیات کیفی گیاه دارویی زوفا. مجله پژوهش‌های زراعی ایران، جلد ۶، شماره ۱، صفحه های ۱۲۷ تا ۱۳۷.

صالح‌راستین ن،۱۳۸۰. کودهای بیولوژیک و نقش آنها در راستای نیل به کشاورزی پایدار. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور (مجموعه مقالات). وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات خاک و آب. صفحه‌های۱-۵۵.

قربانی ه، ۱۳۸۶. مروری بر کودهای بیولوژیک در ایران و نقش آنها درحفظ محیط زیست و سلامت جامعه. مجموعه مقالات دومین همایش ملی کشاورزی بوم شناختی ایران. مهر ماه. گرگان. صفحه‌های ۳۹۰۵-۳۹۱۹.

Adesemoye AO and Kloepper JW, 2009. Plant microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology 85: 1–12.

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. ACIAR Monograph No.147. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.

Garrity GM, 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2. Auflage. Springer, New York, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria

Glick BR, 1995. The enhancement of plant growth by free–living bacteria. Candian Journal of Microbial 41: 109-117.

Husen E, simanungkalit RD, Saraswati R and Irawan B, 2007. Characterization and quality assessment of Indonesian commercial biofertilizers. Indonesian Journal of Agriculture Science 8: 31-3.

Kloepper JW and Scroth MN, 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Pp. 879-882. In proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. Gilbert-Clarey, Torous, France.

Leach AW and Mumford JD, 2008. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. Environmet and Pollution 151:139–147

Motsara MR and Roy RN, 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Sambrook J and Russell DW, 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schaad NW, Jones JB, Chun W, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.Third Edition. The American phytopathological society, Minnesota USA.

Teaumroong N, Wanapu C, Chankum Y, Arjharn W, Sang-Arthit S, Teaimthaisong K and Boonkerd N, 2010. Production and Application of Bioorganic Fertilizers for Organic Farming Systems in Thailand. Microbes at Work, Springer, Berlin Heidelberg.

Vessey JK, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571–586.

Zahir AZ, Arshad M and Frankenberger WF, 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy 81: 97-168.