Archive of SID

نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد ۳۰ شماره ۱ / بهار ۱۳۹۹

کودهای زیستی در کشاورزی پایدار: نگاهی به تحقیقات کودهای زیستی در ایران

محمدرضا ساریخانی*[۱]، روح‌اله امینی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۵

۱- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- دانشیار اکوفیزیولوژی علف هرز، گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

بیش از یک قرن از ظهور کودهای زیستی در عرصه صنعت و کشاورزی دنیا می‌گذرد و افزون بر یک دهه از تولید آنها در کشور ایران سپری شده است. کودهای زیستی در کشاورزی پایدار و ارگانیک جایگاه مهمی دارند. براین اساس در این نوشتار سعی شده است تا با نگاهی بر تاریخچه کودهای زیستی و معرفی نمونه‌های متنوع آنها، مروری بر مکانیسم اثر آنها داشته باشیم و جایگاه و وضعیت آنها را در کشور بررسی کنیم. با این توضیح در این مقاله اشاره‌ای به کودهای زیستی نیتروژنی اعم از باکتری‌های *ریزوبیوم*، *ازتوباکترها*، *آزوسپیریلوم*ها خواهد شد، سپس کودهای فسفاتی و حل‌کنندگان فسفات و سایر باکتریهای محرک رشد گیاه اعم از تولیدکنندگان هورمون‌های رشد، مولدان سایدروفور و باکتری‌های آزادکننده پتاسیم از نظر خواهند گذشت. توجه به قارچ‌های میکوریز از دید این مقاله پنهان نمانده است. اشاره‌ای مختصر به روش جداسازی گونه‌های مهم میکروبی با پتانسیل کاربرد در کودهای زیستی در انتهای هر بخش از مقاله مورد توجه قرار گرفته است. در پایان اشاره‌ای به تحقیقات انجام یافته و استفاده از این کودها در آزمایشات مختلف و پیامد آنها بر رشد گیاهان و خصوصیات کمی و کیفی شده است.

واژه های کلیدی: باکتری‌های آزادکننده پتاسیم، تثبیت‌کنندگان نیتروژن، حل‌کنندگان فسفات، کود زیستی، زادمایه، PGPR

www.SID.ir

Archive of SID

Biofertilizer in Sustainable Agriculture: Review on the Researches of Biofertilizers in Iran

Mohammad Reza Sarikhani[1*], Rouhollah Amini[2]

Received: February 16, 2019 Accepted: January 15, 2020

1-Assoc. Prof., of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
2-Assoc. Prof., Crop-Weed Ecophysiology, Dept. of Plant Ecophysiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
*Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

More than one century ago, the first commercial product of biofertilizer was produced in the world and its production in Iran was initiated around 15 years ago. According to the importance of biofertilizers in the sustainable and organic agriculture, in this paper we try to review on the biofertilizer researches in Iran, especially to the mechanism of biofertilizers actions. This paper will focus on nitrogen biofertilizers mainly to the Rhizobia, Azotobacteria, Azospirilla as well as the phosphate solubilizing bacteria (PSB) and potassium releasing bacteria (KRB). Attention to the Arbuscular Mycorrhiza (AM) is the other aspect of this study. The isolation methods of most important microorganisms with potential to being used as a biofertilizer are taken into consideration at the end of each section of this article. At the end, we considered results of some researches on application and effects of biofertilizers on growth, yield and quality properties of plants in Iran.

Keywords: Inoculum, Potassium Releasing Bacteria, Nitrogen Fixing, Phosohate Solubilizing, Biofertilizer, PGPR

مقدمه

رشد جمعیت و افزایش روزافزون تقاضای بشر برای غذا، به همراه بحران‌های زیست محیطی از جمله مسایل مورد توجه در جهان به شمار می‌روند. این مسائل با تولیدات کشاورزی مرتبط است و ضروری است که چاره‌ای برای آنها اندیشیده شود. جمعیت حال حاضر دنیا بالغ بر ۷ میلیارد نفر است و پیش‌بینی می‌شود تا ۵۰ سال آینده به ۱۰ میلیارد نفر برسد (گلیک ۲۰۱۲؛ گوسوامی و همکاران ۲۰۱۶). در قرن بیست و یکم تامین غذای جمعیت کره زمین چالش بزرگی برای بخش کشاورزی به حساب می‌آید. افزون بر موارد فوق تنش‌های غیرزیستی و زیستی تهدیدی بر تولیدات کشاورزی است. شور و سدیمی شدن خاکها، فرسایش و تخریب اراضی، خشکسالی و گرمایش جهانی، بیماریها و عوامل بیماریزا از جمله استرس‌های تهدیدکننده تولید به شمار می‌روند. به گونه‌ای که آمارها نشان می‌دهد، ۱۳ درصد از اراضی آسیا و اقیانوسیه به دلیل مواجه با شوری، سدیمی شدن و خشکسالی

www.SID.ir

Archive of SID

تخریب شده‌اند یا عوامل بیماریزای قارچی که به تنهایی حدود دو سوم کل بیماریهای گیاهی را شامل می‌شود، می‌تواند میزان تولیدات کشاورزی را تا ۳۰٪ کاهش دهد (گوسوامی و همکاران ۲۰۱۶). در مواجه با مشکلات فوق ضروری است به گزینه‌های پرداخته شود که ضمن حفظ سلامت خاک‌ها و اراضی کشاورزی و کاهش مسائل زیست محیطی، تولیدات کشاورزی را نیز افزایش دهد. استفاده از پتانسیل زیستی خاک یا جامعه میکروبی مفید خاک اعم از باکتریها و قارچها به عنوان یک راهکار امیدبخش در کشاورزی پایدار مطرح است. کشاورزی پایدار شامل مدیریت موفق منابع طبیعی کشاورزی در جهت تامین نیازهای بشر می‌باشد در حالی‌که کیفیت محیط حفظ شده یا ارتقا پیدا می‌کند و منابع طبیعی حفظ می‌شوند. این رویکرد بایستی از نظر بیولوژیکی امکان‌پذیر، از نظر اکولوژیکی پایدار، از نظر اقتصادی بادوام و از نظر اجتماعی قابل پذیرش باشد (زورتا و همکاران ۲۰۱۸). پایداری با راهکارهایی مثل به حداقل رساندن کاربرد نهاده‌های خارجی، استفاده حداکثر از مزایای فرآیندهای طبیعی و استفاده بهینه از منابع داخلی حاصل می‌شود (نایاک و پاتانگرای ۲۰۱۵).

تنوع و شمار جمعیت میکروبی در آشیان های اکولوژیک متغییر بوده و سهم باکتریها از این میان بیشتر است و می‌توانند با گیاه اثرات متقابل خنثی، مفید یا مضر داشته باشند (گلیک ۲۰۱۲). به صورتی‌که شمار باکتریها در ریزوسفر گیاهان، ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از خاک غیرریزوسفری است. آزاد شدن مواد فتوسنتزی گیاه (حدود ۵ تا ۳۰٪) به شکل قندهای مختلف در محیط اطراف ریشه عاملی برای حضور جمعیت میکروبی بالا در این ناحیه می‌باشد (گوسوامی و همکاران ۲۰۱۶). حدود ۲ تا ۵ درصد باکتریهای ریزوسفری به عنوان باکتریهای محرک رشد گیاه (PGPB یا PGPR)[1] شناخته می‌شوند (گوسوامی و همکاران ۲۰۱۶). این گروه از باکتریها متعلق به جنس‌هایی نظیر *ریزوبیوم*، *ازتوباکتر*، *آزوسپیریلوم*، *سودوموناس*، *باسیلوس*، *تیوباسیلوس*، *بورخولدریا*، *فرانکیا*، *آرتروباکتر*، *اسینتوباکتر*، *اگروباکتریوم*، *سراشیا* و ... می‌باشند، و به روش‌های مختلف باعث تحریک رشد گیاه و افزایش آن می‌شوند.

مکانیسم‌هایی که به کمک آن PGPB باعث تحریک رشد گیاه می‌شوند به دو گروه کلی ۱) مکانیسم مستقیم و ۲) مکانیسم غیرمستقیم تفکیک می‌شوند. هر سازوکاری که در آن باکتری به صورت مستقیم به رشد گیاه کمک نماید نظیر تامین عناصر غذایی، یا تولید تنظیم‌گرهای رشد (هورمون‌ها) به نام مکانیسم مستقیم شناخته می‌شود. در حالی‌که سازوکارهایی که گیاه را از استرس‌های زیستی و غیرزیستی محافظت نموده و به رشد آن کمک نموده به عنوان مکانیسم غیرمستقیم شناخته می‌شود (گوسوامی و همکاران ۲۰۱۶؛ کاظمی اسکویی و همکاران ۲۰۱۸). با این توضیح تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفر و تامین سایر عناصر غذایی، آزادسازی پتاسیم و تولید هورمون‌های رشد نظیر اکسین، سیتوکینین جزء مکانیسم مستقیم PGPR محسوب می‌شوند و تولید سایدروفور، آنتی‌بیوتیک، آنزیم‌های هیدرولیزکننده دیواره سلولی عوامل بیماریزا و غیره جزء مکانیسم غیرمستقیم اثربخشی باکتریهای محرک رشد درنظر گرفته می‌شود (گلیک ۲۰۱۲). به دلیل نقش و کارکرد مثبت این گروه از باکتریها در رشد گیاه، کنترل عوامل بیماریزا یا تعدیل اثرات مضر تنش‌های محیطی نظیر شوری، خشکی و غیره، امروزه شاهد تولید و عرضه آنها در قالب کودهای زیستی هستیم. استفاده از کودهای زیستی در کشاورزی به سال‌های اخیر بر می‌گردد. کودهای زیستی شامل تثبیت کنندگان نیتروژن و باکتری‌های حل‌کننده فسفات و قارچ میکوریز می‌باشند. در دهه ۱۹۹۰ تولید و استفاده از کودهای زیستی افزایش مناسبی داشت. در حال حاضر کودهای زیستی به طور فزاینده در کشورهای مختلف استفاده می شوند (فائو ۲۰۱۹).

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

www.SID.ir

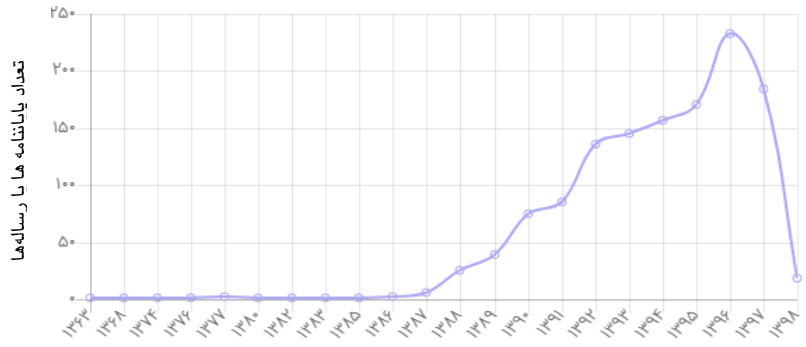
Archive of SID

اولین کود زیستی در سال ۱۸۹۵ به نام نیتراژین که حاوی زادمایه (Inoculant / Inoculum) سویا یعنی باکتری *Bradyrhizobium japonicum* بود در آمریکا تولید و وارد بازار شد. سابقه استفاده از کود زیستی در ایران به سال ۱۳٤۰ باز می‌گردد، استفاده از نمونه وارداتی زادمایه ریزوبیومی گیاه سویا همزمان با توسعه کشت این گیاه در ایران عملی شد (اسدی رحمانی و همکاران ۲۰۱۳). گرچه تحقیقات در زمینه کودهای زیستی در ایران به سال ۱۳۵۰ برمی‌گردد، اما سنگ بنای تحقیقات اساسی در بیولوژی خاک که منجر به ظهور نسل نخستین کودهای زیستی در کشور شد، به سال ۱۳۷۵ بازمی‌گردد. نتیجه این تلاش‌ها در کشور، منجر به عرضه اولین کود زیستی در سال ۱۳۷۹ شد که در آن از زادمایه ریزوبیومی سویا استفاده می‌شد (اسدی رحمانی و همکاران ۲۰۱۳).

در تحقیقات جدید توجه ویژه‌ای به پتانسیل‌های میکروبی در سطح دنیا شده است و میکروارگانیسم‌های مختلف در قالب کودهای زیستی در پژوهش‌های گوناگون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به شکلی که شاهد رشد فزاینده آن در دو دهه اخیر می‌باشیم (جدول ۱). نگاهی به جدول ۱ که در استخراج نتایج آن صرفاً به اطلاعات موجود در دو پایگاه استناد شده است، گویای این موضوع می‌باشد. سعی شده است مقایسه تولیدات علمی داخل کشور و سطح جهانی مورد توجه قرار گیرد. همچنین آمار استخراجی از ایرانداک نشان می‌دهد که در سال‌های اخیر شاهد رشد چشمگیری از انجام پایاننامه‌ها و رساله‌های دکترا در این حوزه هستیم. به صورتی‌که تعداد ۱۲۹۲ مورد یافت شده با کلید واژه "کود زیستی" از الگوی توزیع مطابق شکل ۱ در سنوات مختلف بهره‌مند است (شکل ۱).

جدول۱- اطلاعات مربوط به تولیدات علمی مستخرج از پایگاههای داخلی و خارجی در مورد کودهای زیستی

پایگاه/سال/کلید واژه مورد جستجو	2000-2009 (۱۳۷۸-۱۳۸۸)	2010-2019 (۱۳۸۹-۱۳۹۸)	کلید واژه
پایگاه Sciencedirect	۷۸	٥۳٤	Biofertilizer
پایگاه Sciencedirect	۰	۲٦	Biofertilizer+Iran
پایگاه Magiran	٤۰	۹۱۰	کود زیستی



شکل ۱- آمار مربوط به تعداد پایاننامه‌ها و رساله‌های ثبت شده در طول سال‌های مختلف در ایران داک.

www.SID.ir

Archive of SID

از تولید کود زیستی در ایران نزدیک به دو دهه می‌گذرد و زادمایه‌های میکروبی شامل باکتریهای تثبیت‌کننده نیتروژن اعم از *ریزوبیوم‌ها*، *ازتوباکترها*، *آزوسپیریلوم*ها، باکتری‌های حل‌کننده فسفات نظیر *سودوموناس*ها، *باسیلوس*ها و یا دیگر باکتری‌ها، در قالب کودهای زیستی مختلف استفاده، تولید و عرضه شده‌اند (بشارتی و همکاران ۲۰۱۷). امروزه شاهد ظهور شرکت‌هایی با نام‌های مختلف و محصولات مختلف هستیم که بیش از ۱۵ نوع کود زیستی با اسامی تجاری و حاوی باکتری‌های مختلف تولید می‌گردد (جدول ۲).

امروزه در ایران بیش از ۳۵ شرکت به عضویت انجمن صنفی تولیدکنندگان فرآورده‌های آلی و زیستی کشاورزی درآمده‌اند که از این میان نزدیک به ۱۵ شرکت مشغول به تولید کودهای زیستی هستند و به نظر در آینده‌ای نزدیک شاهد رشد چشمگیر آنها در این حوزه باشیم.

جدول ۲- شرکت‌های فعال در حوزه تولید و عرضه کودها و سموم بیولوژیک [*]

نام شرکت	محصولات تولیدی	سال تأسیس
فرآوری شیمیایی زنجان	بیوآلفا، بیوسوی، بیوبین، بیوپی، بیوفسفات طلایی، فسفاتین، نیتراژین، ازتوباکتین حشره‌کش Bt و قارچ‌کش Subtilis	۱۳۶۲
ایران ایگنیشن	بیوفسفات گرانوله مایه تلقیح حل‌کننده فسفر	۱۳۷۶
فناوری زیستی طبیعت‌گرا	بیوفار، بیوسوی، بیوفسفات تریپل، به رشد، مایکوگرو	۱۳۷۹
آلکان، گروه فرآورده‌های آلی و بیولوژیک	آلکازت، آلکازت پلاس، فسفازت، آگروبیوآلکان و مجیک بیوآلکان	۱۳۷۹
فناوری زیستی مهر آسیا	نیتروکسین، سوپرنیتروپلاس، بیوسوپرفسفات و سموم بیولوژیک	۱۳۸۰
فرآورده‌های بیولوژیک ایناگروپارس	کود زیستی و مکمل‌های خوراک دام	۱۳۸۱
زیست‌فناوری سبز	ازتوبارور، بارور۲ و پتابارور، روئین	۱۳۸۲
صنایع زیست‌فناوری کارا	نیتروکارا، نیتروکارا طلایی، فسفونیتروکارا، تریکوکارا، متاکارا و باسیلوکارا	۱۳۸۴
توسعه کشاورزی البرز سنگسر	بیوازت	۱۳۸۴
خوش زیست جاوید	کود آلی زیست‌پویا	۱۳۸۷
دانش بنیان تمیشه	بیوآزوسپیر	۱۳۹۰
کشت‌کار گستر نوژان	نیتروزیست، فسفو زیست	۱۳۹۱
زیست‌فناور توران	قارچ میکوریز (مایکوسوپرپلاس، مایکوپرسیکا)	۱۳۸۰
راهبر زیست‌فناور البرز	کود زیستی ازته	۱۳۹۳
خوشه‌پروران زیست‌فناور	نیتروباکتر دایان، پتاس‌پاورباکتر دایان، فسفوپاورباکتر دایان، سولفوپاورباکتر دایان	۱۳۹۲

*اطلاعات به دست آمده از انجمن صنفی تولیدکنندگان فرآورده‌های آلی و زیستی کشاورزی (www.iapobp.ir)

نیتروژن و کودهای زیستی نیتروژنی

در غالب سیستم‌های کشاورزی نیتروژن به عنوان عنصر محدودکننده تولید محصول شناخته می‌شود. به رغم حضور مقادیر فراوان نیتروژن در اتمسفر، اما گیاهان قادر به استفاده از این منبع نمی‌باشند و برای اینکه این منبع عظیم برای گیاهان قابل

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شود بایستی طی فرایند تثبیت شیمیایی یا بیولوژیکی به فرم آمونیم و قابل دسترس گیاه تبدیل شود. به بیان دیگر موجودات در اقیانوسی از نیتروژن به سر می‌برند اما تنها گروه خاصی از آنها (تثبیت‌کنندگان نیتروژن) قادر به استفاده از آن می‌باشند. در روش تثبیت شیمیایی که به واکنش هابر و بوش معروف است نیتروژن مولکولی به شکل کودهای شیمیایی تبدیل می‌شود. انجام این فرایند نیاز به فشار بالا (۲۰ Mpa) و دمای بالا (۴۰۰ تا ۵۰۰ درجه سلسیوس) دارد و برای تولید یک تن آمونیم نیاز به ۸۷۵ مترمکعب گاز طبیعی و ۵/۵ بشکه نفت می‌باشد. اما در فرایند تثبیت بیولوژیک تنها گروه خاصی از پروکاریوت‌های دی‌آزوتروف به واسطه داشتن آنزیم نیتروژناز قادر به تثبت نیتروژن مولکولی به فرم آمونیم هستند. این واکنش بر خلاف واکنش نخست در دما و فشار معمولی و با استفاده از آنزیم‌های فوق انجام می‌گیرد. تمام باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن (از قبیل *ریزوبیوم‌ها*، *ازتوباکتر*، *آزوسپیریلوم*، *فرانکیا*، *سیانوباکتر* و سایرین) انجام این واکنش را از طریق آنزیم نیتروژناز کاتالیز می‌کنند. این آنزیم از دو زیرواحد به نام‌های: ۱) پروتئین Fe (دی‌نیتروژناز ردوکتاز) و ۲) پروتئین Fe-Mo (دی‌نیتروژناز) تشکیل شده است. مکانیسم تثبیت نیتروژن در همه باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مشابه است و برای احیاء یک مولکول نیتروژن، ۱۶ ATP در شرایط درون شیشه‌ای[1] وتحت شرایط مزرعه ۳۰-۲۰ ATP مورد نیاز است (براهماپراکاش و ساهو، ۲۰۱۲). گرچه اندازه‌گیری میزان تثبیت بیولوژیکی نیتروژن (BNF[2]) در زیست‌کره کار آسانی نمی‌باشد اما مقدار آن تقریباً ۱۰۷ میلیون تن در سال برآورد می‌شود که حدود ۱/۵ برابر کمتر از مقدار تثبیت نیتروژن به وسیله بشر (تثبیت شیمیایی)، یعنی ۱۶۰ میلیون تن در سال است (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲).

فرآیند صنعتی تثبیت نیتروژن (تولید آمونیاک) به شدت به کاربرد سوخت فسیلی وابسته بوده که سهم عمده انرژی مصرفی بشر را تشکیل می‌دهد. مقدار انرژی مورد نیاز برای تولید ۱ کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژنه ۱۱/۲ کیلو وات ساعت است (نایاک و پاتانگرای ۲۰۱۵)، این در حالی است که برای کود فسفره ۱/۱ کیلو وات ساعت و برای کود پتاسیمی ۱ کیلو وات ساعت انرژی لازم می‌باشد (نایاک و پاتانگرای ۲۰۱۵). لذا عمومی کردن کاربرد تکنولوژی کم هزینه کودهای زیستی در جامعه کشاورزی برای حصول سود بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

تثبیت بیولوژیکی نیتروژن

BNF فرایندی در انحصار دی‌آزوتروف پروکاریوت اعم از باکتری‌ها و آرکئی‌آ است. گرچه تعداد محدودی از گونه‌های باکتریایی قادر به تثبیت نیتروژن می‌باشند اما تنوع فیزیولوژیکی (شامل گروه هتروتروف‌ها، لیتوتروف‌ها) و فیلوژنتیکی بالایی دارند. از این باکتری‌ها می‌توان به باکتری‌های *ریزوبیوم*، *ازتوباکترها*، *آزوسپیریلوم*، *هرباسپیریلوم*، *گلوکونواستوباکتر*، *کلبسیلا*، *اِنتروباکتر*، *باسیلوس*، *پنی‌باسیلوس*، *کلستریدیوم*، *دِسولفوویبریو*، *کروماتیوم*، *ردوباکتر*، *اوسیلاتوریا*، *نوستوک* و *آنابنا* اشاره نمود (پائول ۲۰۰۷). در برخی منابع تثبیت‌کنندگان نیتروژن را در دو گروه کلی همزیست‌ها (که شامل باکتریهای ریزوبیوم است) و آزادزی‌ها (که اختصاصیت و ویژگی برای میزبان خاص ندارند) تقسیم می‌کنند و در گروه دوم تثبیت کنندگانی نظیر *آزوسپیریلوم*، *ازتوباکتر*، *بورخولدریا*، *هرباسپیریلوم*، *باسیلوس* و *پنی‌باسیلوس* و سایر باکتریها قرار می‌گیرد (گوسوامی و همکاران ۲۰۱۶). BNF فرایندی است که با وساطت کمپلکس آنزیمی به نام نیتروژناز انجام می‌گیرد و تا کنون سه

[1] in-vitro
[2] Biological Nitrogen Fixation

www.SID.ir

Archive of SID

فرم متفاوت نیتروژناز بر اساس حضور فلزات مولیبدن (Mo)، آهن (Fe) و یا وانادیم (V) که بخش حیاتی در کوفاکتور آنزیم می‌باشد، شناسایی شده است. اغلب نیتروژنازهای مطالعه شده دارای کوفاکتور مولیبدن هستند. حداقل ۲۰ ژن و تولیدات آنها برای سنتز سیستم آنزیم فعال در تثبیت نیتروژن مورد نیازند، این ژن‌ها با نام ژن‌های *nif* (nitrogen-fixation) شناخته می‌شوند. این ژن‌ها به صورت کلاستر در قالب ۷ اپرون قرار دارند و طولی بین ۲۰ تا ۲٤ جفت باز دارا می‌باشند (گلیک ۲۰۱۲). فرایند تثبیت نیتروژن یک فرایند کاتالیتیکی کند و آهسته می‌باشد بدین معنی که برای تثبیت یک مولکول نیتروژن زیرواحدهای آنزیمی بایستی هشت بار کنار هم قرار گرفته و جدا شوند، برای جبران این مساله مقدار این آنزیم در سلول تا ۱۰٪ کل پروتئین‌های سلول دی‌آزوتروف‌ها را تشکیل می‌دهد. بعلاوه این پروتئین نسبت به حضور اکسیژن بسیار حساس بوده و در شرایط هوازی به صورت غیرقابل برگشت واسرشته می‌شود (پائول ۲۰۰۷). ژن *nif* در بین تثبیت‌کنندگان ازت شدیداً حفاظت شده است و در همه دی‌آزوتروف‌های متعلق به پروتئوباکتر، NifA به عنوان فعال‌کننده رونویسی برای بیان دیگر ژنهای *nif* لازم است (استینهوت و واندرلیدن ۲۰۰۰).

تثبیت نیتروژن به شیوه همزیستی

در تثبیت نیتروژن به صورت همزیستی[1] می‌توان از همزیستی ریزوبیوم-لگوم، همزیستی اکتینوریزی و همزیستی آزولا نام برد. همزیستی ریزوبیوم-لگوم از جمله مهم‌ترین نمونه‌های تثبیت نیتروژن به شیوه همزیستی می‌باشد. این همزیستی بیش از یک قرن پیش توسط دانشمندان آلمانی به نام‌های هلریگل و ویلفارس شناخته شد. طرف میزبان مشارکت‌کننده در این همزیستی (Macro-symbiont) گیاهان لگوم می‌باشد که در ۳ زیرخانواده تقسیم شده و ۷۰۰ جنس و ۱٤۰۰۰ گونه را در خود جای می‌دهند و از این میان تنها ۲۰۰ گیاه لگوم به وسیله بشر کشت و کار می‌شود. میزان نیتروژن تثبیت شده از طریق همزیستی در هر سال به ازاء هر هکتار با توجه به نوع گیاه لگوم بین ۵۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم متغییر می‌باشد (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲؛ شمس‌الدین و همکاران ۲۰۱۷).

طرف باکتری مشارکت‌کننده در این همزیستی (Micro-symbiont) گر چه در گذشته با نام عمومی *Rhizobium* شناخته می‌شد اما تاکسونومی آنها در حال تغییر می‌باشد، آنها در ابتدا بر اساس گروه‌های هم تلقیح[2]، سپس بر اساس سرعت رشد (به ریزوبیای تندرشد و کندرشد) (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲) و امروزه بر اساس توالی 16S rRNA در ۱۸ جنس قرار می‌گیرند (شمس‌الدین و همکاران ۲۰۱۷). این در حالی است که ۲۳۸ گونه شناخته شده مرتبط با این باکتریها در سال ۲۰۱٤ تنها در ۱٤ جنس قرار می‌گرفتند و تعداد گونه‌های شناخته شده آنها به ۹۸ گونه می‌رسید (شمس‌الدین و همکاران ۲۰۱۷)، و در سالیان گذشته این باکتریها تنها در ۱۰ جنس پراکنده بودند (پائول ۲۰۰۷؛ براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲). برخی از ریزوبیاها گرچه از نظر فیلوژنتیک در خارج از ریزوبیوم‌های سنتی قرار می‌گیرند ولیکن دارای ژنهای *nod* رمزکننده فاکتورهای Nod می‌باشند (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲).

همزیستی اکتینوریزی[3] بین اکتینومیست فرانکیا (*Frankia*) و گیاهان میزبان بوته‌ای، درختچه یا درختان شکل می‌گیرد. این همزیستی در ۲۵ جنس از گیاهان دولپه‌ای نظیر (سنجد، توسکا، کازوآرینا و ...) دیده می‌شود. این همزیستی به ویژه در سیستم‌های جنگلی-کشاورزی مفید واقع می‌شود و میزان تثبیت بیولوژیک نیتروژن در هر سال به ازاء هر هکتار ۹۰

[1] Symbiotic Nitrogen Fixation

[2] Cross Inoculation Groups

[3] Actinorhizal Symbiosis

www.SID.ir

Archive of SID

کیلوگرم گزارش شده است (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲).

همزیستی آزولا[1] بین *سیانوباکتر Anabaena azollae* و سرخس آبی Azolla تشکیل می‌شود. از این همزیستی در شالیزارهای برنج به ویژه در کشورهایی نظیر فیلیپین، چین، ویتنام، تایلند و سریلانکا به عنوان کود زیستی نیتروژنی استفاده می‌شود و به دلیل C/N پایین، بقایای این همزیستی سریعاً تجزیه شده و نیتروژن مولکولی تثبیت شده در آن به فرم معدنی و قابل استفاده برای گیاه برنج در اختیار آن قرار می‌گیرد. در فاصله بین دو کشت یا قبل از کشت برنج، از آزولا استفاده نموده و با برگرداندن آن به خاک شالیزار باعث تجزیه و معدنی شدن آن می‌شوند، در مواردی هم همراه با کشت برنج استفاده می‌شود که در این حالت علاوه بر تثبیت نیتروژن می‌تواند مانع از گسترش علف‌های هرز نیز شود (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲).

با توجه به اهمیت ریزوبیوم‌ها در تثبیت نیتروژن در گیاهان لگوم، جداسازی این دست از باکتری‌ها نیز با مراجعه به گیاهان میزبان مناسب صورت می‌پذیرد. پس از برداشت ریشه گیاه لگوم اقدام به شستشوی ریشه نموده و گره‌های سالم، درشت، صورتی یا گوشتی‌رنگ و نزدیک طوقه گیاه که اصطلاحاً به نام گره‌های فعال شناخته می‌شوند جدا شده و پس از انجام ضدعفونی با اتانول و کلرید جیوه، در لوله آزمایش حاوی آب مقطر استریل به کمک میله شیشه‌ای اقدام به له نمودن گره می‌شود (شکل ۲). در این حالت باکتریهای همزیست به فرم باکتروئید قابل مشاهده هستند (مطابق شکل ۲). از سوسپانسیون باکتریایی ریزوبیوم یا مستقیماً به کمک سیم کشت بر روی محیط کشت YMA کشت می‌شود یا پس از تهیه سری‌های رقت این کار صورت می‌پذیرد. به دلیل وجود کنگورِد در محیط کشت که برای متمایز نمودن باکتریهای *اگروباکتریوم* بکار می‌رود، بعد از انکوباسیون در پلیت، شاهد رشد و تشکیل کلنی‌های شفاف، لزج و محدب خواهیم بود. این کلنی منتسب به *ریزوبیوم* می‌باشد (گریتی و همکاران، ۲۰۰٤). در روشی دیگر که به روش جداسازی به وسیله سوزنمعروف است، به جای له گردن گره‌ها، گره‌های درشت‌تر انتخاب شده و پس از ضدعفونی سطحی آن، در شرایط استریل اقدام به برش عرضی آن شده و به کمک سوزن یا سیم کشت از مرکز گره جهت کشت در محیط YMA استفاده می‌شود.

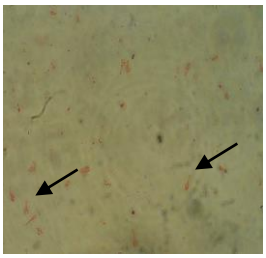
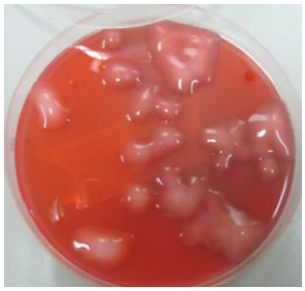
تثبیت نیتروژن به شیوه آزادزی و همیار

در تثبیت نیتروژن به شیوه آزادزی و همیار می‌توان از سیانوباکترها، *ازتوباکتر*، *آزوسپیریلوم* و *Gluconoacetobacter diazotrophicus* نام برد. مهمترین باکتری‌های گروه تثبیت‌کنندگان نیتروژن به شیوه آزادی متعلق به *Azotobacter*، *Derxia* و *Beijerinkia* می‌باشد. از این میان ازتوباکترها پتانسیل این را دارند که به عنوان کود زیستی استفاده شوند و مرسومترین گونه متعلق به این جنس، گونه *A. chroococcum* می‌باشد که قادر به تثبیت ۱۰ mg N/g به ازاء هر گرم کربن مورد استفاده در شرایط درون شیشه‌ای است، این مقدار در مورد تثبیت همزیستی بین ۲۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم نیتروژن می‌باشد (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲). براساس سایر گزارشات، مقادیر نیتروژن تثبیت شده به وسیله باکتری *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم* بین ۲۰ تا ۳۰ کیلوگرم در هکتار می‌باشد (گوسوامی و همکاران ۲۰۱٦). همچنین این جنس به عنوان تولیدکننده هورمون‌های رشد گیاه از قبیل IAA، جیبرلیک اسید و بازدارنده‌های رشد قارچ شناخته شده است. در کشور هند این باکتری به عنوان کود زیستی استفاده می‌شود و باعث افزایش عملکرد محصولات مختلف در کاربرد تلفیقی آن به همراه منابع کود نیتروژنه شده است. سابقه کودهای زیستی در هند به ورود سویا به عنوان یک گیاه غیربومی به این کشور برمی‌گردد و از آن زمان کودهای زیستی به این کشور وارد شدند، زیرا خاک‌های هند عاری از باکتری‌های *ریزوبیوم*

[1] Azolla-Anabaena Symbiosis

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲- جداسازی باکتریهای ریزوبیوم از گره گیاهان میزبان و کشت روی محیط YMA، در شکل وسط باکتروئیدها قابل مشاهده هستند (علیزاده و همکاران ۲۰۱۸)

(*B. japonicum*) گره‌ساز بر ریشه سویا بود (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲).

Azospirillum lipoferum یکی از معمول‌ترین باکتری‌های ساکن خاک می‌باشد که اولین بار به وسیله بیجرینک در سال ۱۹۲۵ شناسایی شد. این یک باکتری همیار می‌باشد که با تولید هورمون‌هایی نظیر IAA و جیبرلین‌ها به تحریک رشد گیاه کمک می‌کند. مواد محرک رشد گیاه از قبیل پانتوتنیک اسید، تیامین و نیاسین به مقدار زیاد توسط این گونه تولید می‌شود که به بهبود رشد گیاه و عملکرد آن کمک می‌کند. کاربرد *آزوسپیریلوم* به همراه گیاه ذرت سبب افزایش عملکرد محصول در مقادیری معادل با مصرف ۶۰ کیلوگرم اوره در هکتار می‌شود (براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲).

G. diazotrophicus در بخش درونی ریشه نیشکر کلنیزه نموده و تثبیت نیترون را انجام می‌دهد. این باکتری در بافت آوندی گیاه (آوند چوبی) مستقر شده و به دلیل عدم وجود رقابت با سایر باکتری‌ها کارایی آن بالا می‌رود. این باکتری اندوفیت اولین بار در دهه هشتاد در برزیل شناسایی شد و با نام *Acetobacter diazotrophicus* معرفی شد. حضور این باکتری در سایر گیاهان نیز گزارش شده است. از ویژگی‌های بارز این باکتری رشد در غلظت بالای ساکاروز (۳۰٪) و pH ۵/۵ می‌باشد. میزان تثبیت نیتروژن این باکتری در گیاه نیشکر تا ۱۵۰ kg N/ha گزارش شده است (پائول ۲۰۰۷؛ براهماپراکاش و ساهو ۲۰۱۲).

مطالعات در اواخر قرن بیستم نشان داد که باکتری‌های دی‌آزوتروف متنوعی در ریشه های علف‌های گرمسیری به ویژه در پاسپالوم و دیجیتاریا حضور دارد. این باکتری‌ها به جنس‌های *Azospirillum*، *Herbaspirillum* و *Burkholderia* تعلق داشتند (پائول ۲۰۰۷). از جمله باکتری‌های دی‌آزوتروف دیگر که غالباً به صورت اندوفیت می‌باشند می‌توان به *Acetobacter diazotrophicus*، *Herbaspirillum seropedicae* و *Azoarcus* spp. اشاره داشت (استینهوت و واندرلیدن ۲۰۰۰).

با گذشت زمان علاوه بر باکتریهای فوق، باکتریهای دیگری نیز از منظر تثبیت نیتروژن مهم شناخته شده‌اند که از این میان به دو جنس *باسیلوس* و *پنی‌باسیلوس* می‌توان اشاره داشت. مطالعات جدید نشان داده است که کلاستر ژنی *nif* در این باکتریها نیز حضور دارد و قادر به تثبیت نیتروژن هستند. باید به این نکته توجه داشت که در تاکسونومی جدید باکتریها، برخی از گونه‌های جنس *باسیلوس* به جنس جدیدی به نام *پنی‌باسیلوس* تغییر نام یافتند و از آنها جدا شدند، در صورتی که در گذشته گونه *Bacillus polymyxa* در جنس *باسیلوس* قرار می‌گرفت، اما امروزه آن را به نام *Paenibacillus polymyxa* می‌شناسیم. مطالعات

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داده است که از باکتریهای متعلق به این دو جنس، باکتری *P. azotofixans* دارای بیشترین قدرت تثبیت می‌باشد (گوسوامی و همکاران ۲۰۱۶).

جداسازی *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم*

در این بخش با توجه به اهمیت دو جنس *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم* به جداسازی و شناسایی آنها اشاره می‌شود.

ازتوباکتر

در کتاب راهنمای برگی، Azotobacter به معنای باکتری میله‌ای درگیر در تثبیت ازت یا نیتروژن تعریف شده است. *ازتوباکتر* یک باکتری غیرهمزیست، گِرم منفی، هتروتروف، هوازی و آزادزی می‌باشد. این باکتری قادر به تثبیت نیتروژن بوده و همچنین مواد محرک رشد و ویتامین‌ها را تولید می‌کند. اغلب در اطراف ریزوسفر یافت می‌شود و جمعیت آن در خاک متغیر است اما به ندرت بیش از ۱۰۰۰–۱۰۰ به ازاء هر گرم خاک می‌باشد (موتسارا و روی ۲۰۰۸؛ ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۷). سلول‌های *ازتوباکتر* با توجه به محیط کشت و سن آنها به شکل میله‌ای راست با انتهای مدور، بیضوی شکل تا کوکوئیدی یا کروی دیده می‌شوند. از نظر آرایش این سلول‌ها اغلب به صورت منفرد هستند و به صورت جفت یا رشته‌ای هم می‌توانند باشد، برای مثال باکتری *A. paspali* می‌تواند به صورت رشته‌ای باشد (گریتی و همکاران ۲۰۰٤). این جنس باکتری به γ-proteobacteria تعلق دارد و شامل ۷ گونه به نام‌های *A. chroococcum*، *A. vinelandii*، *A. beijerinckii*، *A. paspali*، *A.armeniacus*، *A. nigricans* و *A. salinestri* می‌باشد (استینهوت و واندرلیدن ۲۰۰۰؛ جیمنز و همکاران ۲۰۱۱). گونه *A. chroococcum* از میان بقیه غالب‌تر می‌باشد و این گونه معمولاً بعد از ٥ تا ۷ روز انکوباسیون به رنگ قهوه‌ای متمایل می‌شود. حضور این باکتری در خاک به اسیدیته و وضعیت حاصلخیزی خاک وابسته است به صورتی‌که در خاکهای با pH خنثی یا کمی قلیایی بیشتر بوده و در خاک‌های اسیدی حضور ندارند یا جمعیت آنها کم می‌باشد (لنارت ۲۰۱۲؛ ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۷). شناسایی گونه‌های *ازتوباکتر* به دلیل تشابه موفولوژیک با سایر جنس‌ها نظیر *Derxia*، *Azomonas* و *Beijerinckia* مشکل می‌باشد و بهره‌گیری از روش-های مولکولی این امر را ممکن و ساده‌تر می‌سازد (جیمنز و همکاران، ۲۰۱۱). *ازتوباکتر* به دلیل داشتن بالاترین نرخ تنفسی در میان موجودات زنده نیز مورد توجه است، این جنس همچنین به تولید کپسول و لایه لزج در محیط کشت‌های جامد حاوی کربوهیدرات‌ها معروف است (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۷).

برای جداسازی آن از خمیره خاک یا معمولاً از محیط جامد عاری از نیتروژن[1] (نظیر LG، Jensen، Burck، Winogrdsky، Brown، Ashby و Beijerinckia) استفاده می‌شود (شکل ۳) و بعد از تهیه سری‌های رقت از نمونه خاک، از رقت‌های پایانی بر روی این محیط‌ها پخش می‌شود. بعد از قرار دادن پلیت‌ها در انکوباتور حداقل بعد از گذشت ۳ روز کلنی‌های نرم، پهن، ترنس‌پرنت یا شیری و موکوئیدی به عنوان *ازتوباکتر* شناخته می‌شود. کلنی اغلب گونه‌ها معمولاً صاف، دارای تحدب کم، مات، براق و موکوئیدی است، اما به هر حال ممکن است تغییراتی نیز در بین آنها وجود داشته باشد. دو گونه *A. paspali* و *A. vinelandii* در مقایسه با دیگر گونه‌های *ازتوباکتر* دارای شباهت بیشتری به هم هستند (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۸؛ گریتی و همکاران ۲۰۰٤). در شناسایی *ازتوباکتر* از این موارد می‌توان بهره جست: الف) تولید پیگمنت، معمولاً گونه‌های *ازتوباکتر* پیگمنت‌های متفاوتی تولید می‌کنند ۲) تولید پلی‌ساکارید و ۳) تولید کیست (cyst) که به منظور بقاء در شرایط نامناسب تولید می‌شود. به عنوان نمونه کلنی‌های *A. chroococcum* بالاآمده، اغلب چسبنده و پلی‌ساکاریدی بوده و پیگمنت

[1] N-free medium

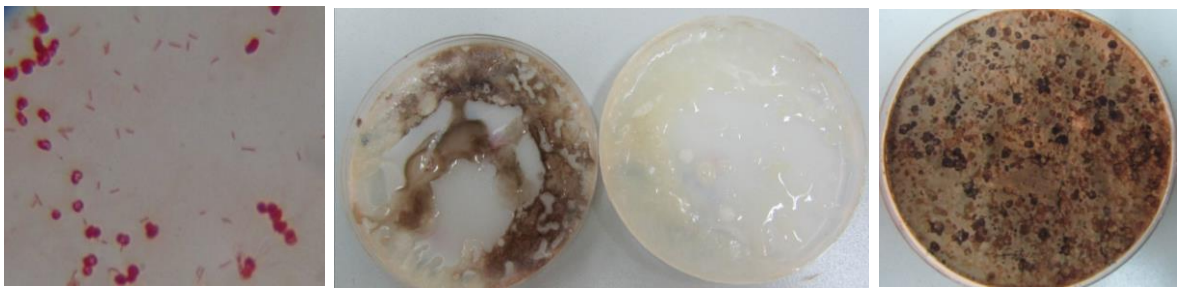
www.SID.ir

Archive of SID

آنها از قهوه‌ای روشن تا تیره تغییر می‌کند (موتسارا و روی ۲۰۰۸؛ ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۷). تشکیل کیست یکی از ویژگی‌های این سلول‌هاست که به نوعی فرم استراحتی سلول‌های رویشی است (گریتی و همکاران ۲۰۰٤).

در این میان گونه‌ای مانند *A. salinestris* گونه وابسته به سدیم است که در خاک‌های نسبتاً شور جداسازی شده است یا *A. paspali* تنها به ریزوسفر گیاه پاسپالوم محدود شده است که شاید این موضوع به توانایی محدود این باکتری در استفاده از بسیاری از مواد آلی موجود در خاک مربوط شود، اما همین مواد آلی به راحتی توسط سایر گونه‌های این باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد (گریتی و همکاران ۲۰۰٤).

پیگمنت تولیدی توسط *A. chroococcum* (قهوه‌ای)، *A. beijerinckii* (قهوه‌ای روشن)، *A. vinelandi* (زرد متمایل به سبز)، *A. insignis* (قهوه‌ای روشن)، *A. agilis* (سبز) و *A. macrocytogenes* (ارغوانی) می‌باشد که در شناسایی آنها می‌تواند استفاده شود (موتسارا و روی ۲۰۰۸). رنگدانه‌های محلول در آب یا نامحلول، در همه گونه‌های آن دیده می‌شود (گریتی و همکاران ۲۰۰٤).



شکل ۳- استفاده از خمیره خاک و محیط وینوگرادسکی در جداسازی ازتوباکترها از خاک (تشکیل پیگمنت، تولید پلی‌ساکارید و تشکیل کیست) (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۸).

آزوسپیریلوم

آزوسپیریلوم اولین بار از یک خاک شنی فقیر در کشور هلند جداسازی شد (یوشا و کانیموژی ۲۰۱۱). *آزوسپیریلوم* یک باکتری مارپیچی شکل می‌باشد که علاوه بر تثبیت نیتروژن قادر به تولید هورمون‌ها و ویتامین‌ها نیز می‌باشد. این باکتری دارای توزیع خوبی در خاک‌ها و ریشه گیاهان علفی می‌باشد. یک باکتری گِرم منفی بوده (یا گِرم متغیر[1]) و به اشکال منحنی و میله‌ای شکل در اندازه‌های مختلف دیده می‌شود. این باکتری اکسیداز مثبت بوده، دارای گرانول‌های PHB (پلی‌بتاهیدروکسی بوتیرات) است و دارای حرکت مارپیچی می‌باشد. تشکیل غشاءهای سفید[2] بر محیط نیمه‌جامد کلسیم مالات از ویژگی‌های *آزوسپیریلوم* می‌باشد. این باکتری روی محیط جامد مالات کلنی‌های مدور (دایره شکل) ایجاد می‌کند و قادر به تشکیل کیست نیز هست. از آنجا که *آزوسپیریلوم* بازهای قوی تشکیل می‌دهد بنابراین در نتیجه رشد آن در محیط حاوی معرف حساس به pH نظیر بروموتیمول‌بلو تغییر رنگ محیط به رنگ آبی رخ می‌دهد. دلیل دیگری که برای این موضوع مطرح می‌شود را باید در واکنش تثبیت نیتروژن جستجو کرد، در نتیجه تثبیت نیتروژن و تبدیل شدن نیتروژن به آمونیاک یا آمونیم، مصرف هیدروژن رخ می‌دهد که مصرف پروتون‌ها باعث افزایش pH

1 Gram-variable

2 white pellicles

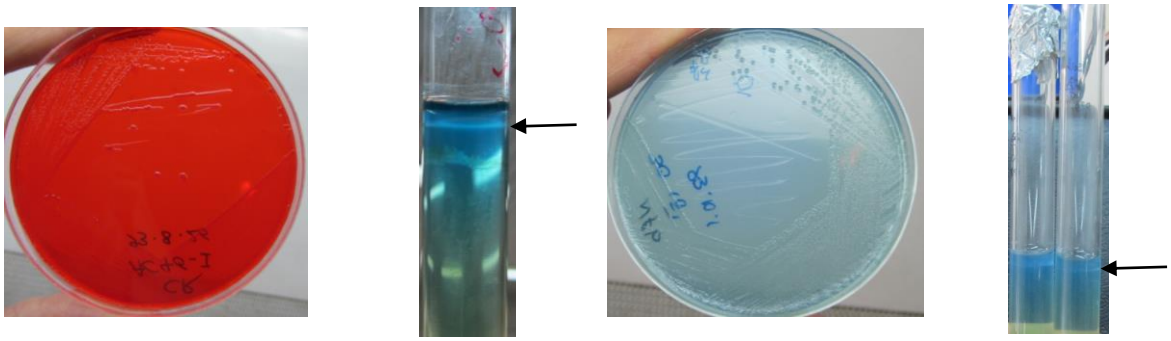
www.SID.ir

Archive of SID

محیط می‌شود (ساریخانی ۲۰۱۵؛ موتسارا و روی ۲۰۰۸؛ کیم و همکاران ۲۰۰۵).

این جنس متعلق به α-proteobacteria می‌باشد و تا کنون ۷ گونه از آن به نام‌های *A. lipoferum*، *A. brasilense*، *A. amazonense*، *A. halopraeferens*، *A. irakense*، *A. largimobile* و *A. doebereinerae* شناخته شده است. این باکتری دارای متابولیسم متنوعی برای استفاده از منابع کربن و ازت می‌باشد و تحت شرایط کمبود مواد غذایی و خشکی می‌تواند به فرم کیست درآید. این جنس به دلیل داشتن تاژک قطبی از جمله باکتریهای متحرک می‌باشد (استینهوت و واندرلیدن ۲۰۰۰؛ کیم و همکاران ۲۰۰۵).

از جمله محیط کشت‌هایی که در جداسازی *آزوسپیریلوم* استفاده شده است عبارتند از (Semi solid malat medium، Nitrogen free bromothymol blue medium و Okons modified medium). با توجه به اینکه حضور این باکتری در درون ریشه و در سطح ریشه بیشتر می‌باشد به همین دلیل از نمونه‌های ریشه گیاهان برای جداسازی آن استفاده می‌شود. مراحل کار به شرح زیر می‌باشد:



شکل ۴- استفاده از محیط نیمه‌جامد و جامد NFb در جداسازی *آزوسپیریلوم*، تشکیل غشاء بالارونده در محیط نیمه‌جامد و ایجاد کلنی‌های قرمز در محیط کنگورد (مرادی و همکاران ۲۰۱۷).

پس از شستشوی ریشه‌ها در زیر آب، سطح خارجی ریشه‌ها با اتانول ۹۵٪ به مدت ۵ ثانیه ضدعفونی می‌شود. سپس ریشه‌ها به قطعات کوچک ۰/۵ سانتی‌متری بریده شده و به مدت ۱ دقیقه با کلرید جیوه ۰/۱٪ تیمار شده و مجدداً شسته می‌شود و به دنبال آن با آب مقطر استریل شسته می‌شود. سپس ریشه‌ها در یک لوله آزمایش حاوی آب مقطر استریل له شده و بعد از تهیه سری‌های رقت، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به لوله آزمایش حاوی محیط نیمه‌جامد NFb انتقال داده می‌شود و در دمای ۳۰-۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۳ تا ٤ روز انکوبه می‌شود. بعد از گذشت مدت زمان انکوباسیون مناسب، غشاء سفیدی از *آزوسپیریلوم* در ۱ یا ۲ سانتی‌متری زیر سطح محیط در یک زمینه آبی تشکیل خواهد شد. به کمک سیم کشت از غشاء سفید به محیط NFb جامد انتقال داده و خالص‌سازی کلنی‌ها انجام می‌گیرد، سپس کلنی‌ها به منظور رویت غشاء سفید مجدداً به محیط NFb نیمه جامد منتقل می‌شوند. تشکیل غشاء واضح زیرسطحی در محیط مالیک اسید تست تاییدی به منظور حضور *آزوسپیریلوم* می‌باشد (ساریخانی ۲۰۱۵؛ موتسارا و روی ۲۰۰۸). در ادامه کشت باکتری در محیط کنگورد و مشاهده کلنی‌های با رنگ قرمز می‌تواند تاییدی بر باکتری *آزوسپیریلوم* باشد (شکل ٤). هرچند سخن گفتن با قطعیت در این مورد نیاز به شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

فسفر و کودهای زیستی فسفاتی

فسفر یکی از عناصر غذایی مهم برای گیاهان می‌باشد که در خاک فراهمی کمی دارد. فسفر در خاک به دو شکل آلی و معدنی یافت می‌شود. توانایی برخی از ریزجانداران به منظور تبدیل فسفر نامحلول به شکل قابل استفاده مانند ارتوفسفات یکی از ویژگی‌های مهم ریزجانداران در افزایش رشد گیاهان محسوب می‌شود. با وجود ترکیبات فسفاته فراوان در خاک، گیاهان فسفر مورد نیاز خود را به شکل آنیون فسفات ($H_2PO_4^-$ یا HPO_4^{2-}) از محلول خاک جذب می‌کنند (ملبوبی و همکاران ۲۰۱٤؛ نوبهار و همکاران ۲۰۱۷). بر خلاف نیتروژن که اتمسفر یکی از منابع عمده آن به شمار می‌رود این عنصر فاقد چنین منبعی می‌باشد (ازاوا و همکاران ۲۰۰۲). فسفر یکی از اجزاء ضروری متابولیسم انرژی، بخشی از اسیدهای نوکلئیک و غشاهای زیستی می‌باشد. فرایندهای اصلی بیوشیمیایی از قبیل فتوسنتز و تنفس به وسیله فسفات معدنی (Pi) یا مشتقات آلی آن فعال می‌شود (راگوتاما و کارتیکیان ۲۰۰۵). فسفر، تثبیت نیتروژن را در گیاهان لگوم تحریک کرده و برای تولید قندها ضروری می‌باشد (ساریخانی ۲۰۱۵).

تفاوت فاحشی بین میزان فسفر درون سلول‌های گیاهی (در حد میلی مولار، mM) و فسفر محلول در خاک (در حد میکرومولار، µM) وجود دارد. به طور میانگین اغلب عناصر معدنی موجود در محلول خاک در مقادیر میلی‌مولار موجودند، در حالی که فسفر در حد میکرومولار حضور دارد (فاگریا ۲۰۰۹). غلظت فسفات محلول در خاک معمولاً خیلی پایین است و مقدار آن ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا کمتر می‌باشد (پائول ۲۰۰۷). سطوح بسیار پایین فسفات قابل جذب در ریزوسفر باعث می‌شود که این عنصر به عنوان یکی از اصلی‌ترین فاکتورهای محدودکننده رشد در بسیاری از زیست‌بوم‌ها شناخته شود. تثبیت معدنی فسفات قابل استفاده در خاک و تشکیل کمپلکس‌های آلی از دلایل اولیه برای فراهمی کم این عنصر به شمار می‌رود (راگوتاما و کارتیکیان ۲۰۰۵).

بزرگترین منابع فسفر در کره زمین، صخره‌ها و دیگر رسوبات از قبیل آپاتیت‌های اولیه و دیگر اشکال معدنی اولیه حاصل شده از دوران‌های زمین‌شناسی است (رودریگز و فراگا ۱۹۹۹؛ پائول ۲۰۰۷). شکل غالب فسفات در شرایط قلیایی، تری‌کلسیم فسفات می‌باشد. سنگ‌های فسفات معدنی از قبیل فلوروآپاتیت و فرانکولیت از جمله منابع فسفات کلسیم می‌باشند که در خاک نامحلول بوده و تامین‌کننده نیاز گیاه نخواهند بود (گلداشتاین ۲۰۰۰). پویایی فسفات در خاک تحت تاثیر فرایند فیزیکوشیمیایی (جذب و واجذب) و زیستی (غیرمتحرک شدن و معدنی شدن) است (پائول ۲۰۰۷؛ فاگریا ۲۰۰۹). مقادیر عمده‌ای از فسفات که در قالب کود به خاک اضافه می‌شود تشکیل رسوب می‌دهد و از دسترس گیاه خارج می‌شود، این موضوع به واکنش‌پذیری بسیار بالای یون ارتوفسفات با کاتیون‌های فلزی از قبیل Al^{3+} و Fe^{3+} در شرایط خاک‌های اسیدی و با یون Ca^{2+} در خاک‌های خنثی تا آهکی مربوط می‌شود (گیانشوار و همکاران ۲۰۰۲).

نیاز به جایگزینی مناسب برای کودهای شیمیایی فسفاته زمانی احساس می‌شود که بدانیم استفاده زیاد از کودهای شیمیایی مخاطرات محیطی و خطراتی برای سلامت انسان به همراه دارد. در عمل بازدهی کودهای شیمیایی فسفاته بین ۲۵-۱۰ درصد می‌باشد (نوبهار و همکاران ۲۰۱۷) و تقریباً ۹۰-۷۵ درصد آن در خاک در اثر واکنش با کاتیون‌های فلزی به صورت رسوب و غیرقابل استفاده گیاه تبدیل می‌شود (استیونسون ۲۰۰۵). از طرف دیگر انرژی لازم برای تولید سالانه کودهای شیمیایی فسفاته چیزی بالغ بر ٤ میلیارد دلار می‌باشد که با صرف هزینه بالایی همراه است (گلداشتاین ۲۰۰۰).

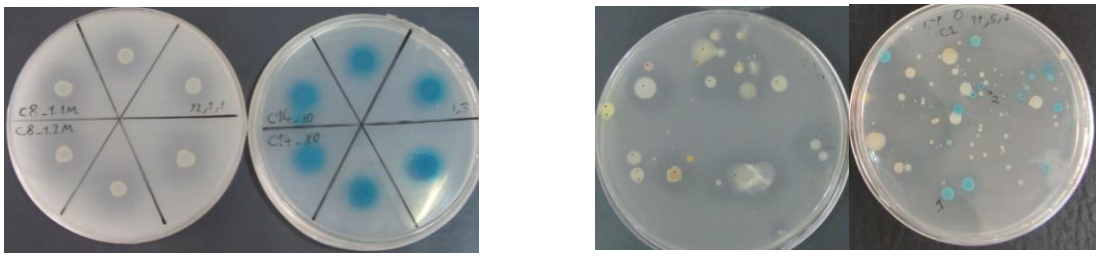
ضرورت یافتن جایگزینی مناسب برای رهاسازی فسفات‌های تجمع یافته در خاک زمانی بیشتر احساس

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود که بر این امر واقف گردیم که منابع فسفاته موجود در خاک، قابلیت تامین فسفات مورد نیاز گیاهان برای تولید بهینه آنها را تا ۱۰۰ سال دارا می‌باشد و کافی است که این منبع عظیم فسفر را به صورتی برای گیاه قابل جذب و استفاده نمود. فراهمی زیستی فسفر قابل جذب در خاک به نوع گیاه، شرایط و سطح تغذیه‌ای و فلور میکروبی خاک بستگی دارد (خان و همکاران ۲۰۰۷). مدارکی مبنی بر نقش ریزجانداران ریزوسفری در انحلال فسفات معدنی به سال ۱۹۰۳ برمی‌گردد. ریزجانداران از طریق معدنی کردن فسفر آلی و انحلال فسفات‌های رسوب یافته فراهم سازی فسفر برای گیاهان را افزایش می‌دهند (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۵). این دسته از ریزجانداران گرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند، ولی بخشی از آن که در محیط آزاد شده است در اختیار گیاه قرار می‌گیرد (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۸). باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها در انحلال فسفات بسیار موثرترند و جمعیت بالایی را به خود اختصاص می‌دهند (آلام و همکاران ۲۰۰۲).

گونه‌هایی از جنس *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Pantoea* و *Rhizobium* از قوی‌ترین حل‌کنندگان فسفات به شمار می‌آیند. سازوکار اصلی برای انحلال فسفات معدنی تولید اسیدهای آلی است و در انحلال اشکال فسفر آلی اسید فسفاتازها نقش اصلی را در خاک بازی می کنند (ملبوبی و همکاران ۲۰۱٤؛ ساریخانی و همکاران ۲۰۱۹). روش مرسوم در جداسازی این دسته از باکتری‌ها استفاده از منابع فسفاته معدنی و آلی کم محلول یا نامحلول در محیط کشت‌های مایع یا جامد می‌باشد، که از طریق پایش تولید فسفات آزاد شده و کاهش pH در محیط مایع یا مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها و تولید کلنی‌های رنگی (سبز ، آبی و زرد) در صورت استفاده از سوبستراهای رنگزا در محیط کشت جامد دنبال می‌شود (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۵) (شکل ۵).



شکل ۵- جداسازی، غربالگری و ارزیابی انحلال فسفات توسط حل‌کنندگان فسفات در محیط دارای فسفر آلی (با ویژگی تولید کلنی آبی) و در محیط دارای فسفر معدنی (با ویژگی تولید هاله شفاف) (نوبهار و همکاران ۲۰۱۷).

پتاسیم و کودهای زیستی پتاسیمی

پتاسیم به همراه نیتروژن و فسفر یکی از سه عنصر ضروری مهم برای رشد گیاه تلقی می‌شود و یکی از منابع تجدیدناپذیر می‌باشد. این عنصر نقش‌های حیاتی در متابولیسم گیاه از قبیل فتوسنتز، انتقال موادی نظیر قندها و نشاسته در گیاه، تنظیم منافذ روزنه گیاهان، فعال‌سازی آنزیم‌ها (بیش از ٦٠ آنزیم)، افزایش کیفیت محصولات باغی و زراعی، افزایش مقاومت گیاه به آفات و بیماریها دارد. پتاسیم در خاک به چهار شکل محلول، تبادلی، غیرتبادلی و ساختمانی وجود دارد. غلظت پتاسیم در محلول خاک بسیار پائین (۰/۱ تا ۰/۲ درصد) است و پتاسیم تبادلی که به وسیله بسیاری از کانیهای سیلیکاته لایه‌ای جذب سطحی شده است ۱ تا ۲ درصد را به خود اختصاص می‌دهد که این دو بخش

www.SID.ir

Archive of SID

برای گیاهان قابل استفاده می‌باشند. پتاسیم غیرتبادلی بین ۱ تا ۱۰ درصد متغیر بوده و در ساختار کانیها مشارکت دارد. به این ترتیب اغلب پتاسیم موجود در خاک در ساختار شبکه کریستالی کانیهای سیلیکاته به ویژه فلدسپارها ($MAlSi_3O_8$: که در آن M معرف ترکیبی از کاتیونهای K^+، Na^{2+} و Ca^{2+} می‌باشد) و میکاها حضور دارد (فاگریا ۲۰۰۹). بیش از ۹۸ درصد پتاسیم موجود در خاک به شکل کانیهای اولیه و کانیهای سیلیکاته (میکروکلین، موسکوویت، ارتوکلاز، بیوتیت، فلدسپار، میکا، ایلایت و ...) می‌باشد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶؛ ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸). پوسته خارجی زمین تقریباً ۳ درصد پتاسیم دارد که بیشترین مقدار آن در کانی‌های اولیه (فلدسپارها و میکاها) و ثانویه (موسکویت، بیوتیت، ایلایت و ورمیکولایت و ...) یافت می‌شوند. میزان پتاسیم در خاک معمولاً خیلی بیشتر از میزان عناصر غذایی پرمصرف دیگر مانند نیتروژن و فسفر می‌باشد. مقدار پتاسیم خاک‌های رسی بیش از خاک‌های لومی است و در خاک‌های شنی میزان آن حداقل می‌باشد (فاگریا ۲۰۰۹).

از دیرباز این باور وجود داشته که مقدار پتاسیم در اغلب خاک‌ها به دلیل حضور کانی‌های غنی از پتاسیم کافی می‌باشد. اما در طی سالیان اخیر که کاربرد و استفاده از رقم‌های هیبرید و با عملکرد بالا مرسوم شده است، همچنین کشت گیاهان پرنیاز (نظیر سیب‌زمینی، گوجه فرنگی، موز و ...) و کشاورزی فشرده بعلاوه آبشویی، فرسایش و رواناب و جایگزین نشدن پتاسیم برداشت شده توسط گیاهان باعث شده است که کمبود پتاسیم در بسیاری از خاک‌ها به دلیل تخلیه منبع پتاسیم قابل استفاده مشاهده شود. مشکل کمبود پتاسیم در خاک‌های درشت بافت مشهودتر می‌باشد. برای مقابله با این مشکل می‌توان به دو شیوه اقدام نمود یکی استفاده از کودهای شیمیایی پتاسیم‌دار و جبران پتاسیم برداشت شده از خاک، اما با در نظر داشتن این نکته که خاک دارای غنای منابع پتاسیم است و بایستی آن را به شکل قابل استفاده برای گیاه تبدیل نمود راهکارهای زیستی پیش روی ما قرار می‌گیرد. در راهکار زیستی می‌توان از کودهای زیستی جایگزین کودهای شیمیایی استفاده نمود (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸).

ریزجانداران نقش کلیدی در چرخه پتاسیم دارند. عناصر موجود در کانی‌ها زمانی برای گیاهان قابل استفاده خواهند بود که کانی‌ها دچار هوازدگی شوند. در این میان ریزسازواره‌های خاک شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها قادر به تخریب ساختار کریستالی کانیها و رهاسازی پتاسیم محبوس در ساختار آن هستند (باساک و بیسواس ۲۰۰۹). با توجه به اینکه شکل غالب پتاسیم در خاک به صورت کانی‌های سیلیکاته است در صورتی که آنها به آرامی دچار هوازدگی زیستی و انحلال قرار بگیرند، پتاسیم برای گیاهان قابل جذب خواهد شد. برخی از گونه‌های باکتری قادر به متحرک‌سازی و رهاسازی پتاسیم در خاک می‌باشند (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸). گزارشاتی مبنی بر تاثیر جامعه میکروبی خاک از جمله قارچ‌های میکوریز (مجللی و وید ۱۹۷۸) و دیگر قارچها و همچنین باکتری‌های خاک نظیر جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Rhizobium* و *Micrococcus* در رهاسازی پتاسیم از منابع خاکی وجود دارد (مرادی و همکاران ۲۰۱۷؛ کشاورز زرجانی و همکاران ۲۰۱۳؛ ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸). اما در این میان در غالب تحقیقات به جداسازی باکتری گونه *B. mucilaginosus* و بررسی تاثیر آن در تغذیه پتاسیمی گیاهان مختلف اشاره شده است (جان آنگ و همکاران ۲۰۱۰؛ باساک و بیسواس ۲۰۰۹). این گروه از باکتری‌ها غالباً هتروتروف و هوازی بوده و سازوکارهایی که برای این ویژگی آنها ارائه شده است شامل تولید و ترشح اسیدهای آلی و پروتون، ترشح پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، تولید لیگاندهای آلی و سایدروفورها می‌باشد. باکتری‌های سیلیکاته یا سیلیکاباکترها (نام تاکسونومیک نمی‌باشد) قادر به رهاسازی فسفات، پتاسیم، سیلسیوم و کلسیم

www.SID.ir

Archive of SID

از سنگ‌های معدنی می‌باشند، و به طور کلی شامل باکتری‌های *B. mucilaginosus*، *B. circulans* و *B. edaphicus* می‌باشند (هنگ بو و همکاران ۲۰۰۶). باکتری *B. mucilaginosus* سال‌های زیادی است که به عنوان کود زیستی پتاسیم در برخی از کشورها از جمله چین مورد استفاده قرار می‌گیرد (لیو و همکاران ۲۰۰۶).

روش مرسوم در جداسازی باکتری‌های آزادکننده پتاسیم استفاده از محیط کشت الکساندروف می‌باشد، در این محیط کشت از منبع کانی‌های پتاسیم نظیر میکا استفاده می‌شود، بکارگیری از آن در فرایند غربالگری به صورت محیط‌های جامد و مایع می‌باشد (مطابق شکل ٦)، گونه‌های باکتریایی که موفق به آزادسازی پتاسیم بیشتری از محیط مایع باشند و همچنین در آزمایشات گلدانی و مزرعه‌ای نیز این ویژگی آنها تایید شود به عنوان کود زیستی پتاسیمی نامزد خواهند شد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸؛ مرادی و همکاران ۲۰۱۷). گرچه پتاسیم آزاد شده در فاز محلول بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد اما ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۹) توجه به پتاسیم ذخیره شده در بیوماس میکروبی را نیز از نظر دور نداشتند. اولین کود زیستی پتاسیمی در کشور در سال ۱۳۹۳ به نام پتابارور وارد بازار مصرف شد.

شکل ۶- جداسازی و ارزیابی آزادسازی پتاسیم توسط باکتریهای آزادکننده پتاسیم در محیط الکساندروف (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸).

کودهای زیستی حاوی باکتریهای محرک رشد گیاه

PGPRها شامل باکتری‌های احاطه‌کنندهٔ ریشه هستند که باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. امروزه PGPR ها به عنوان زادمایه میکروبی به شکل کنترل-گرهای زیستی یا کودهای زیستی استفاده می‌شوند (گلیک ۲۰۱۲). سازوکارهایی که به وسیله آن، PGPRها بر رشد گیاه تاثیر می‌گذارند به دو دسته تقسیم می‌شود: اثرات مستقیم و اثرات غیرمستقیم. اثر غیرمستقیم بیشتر از طریق تولید متابولیت های میکروبی است که اثر منفی بر پاتوژن‌ها دارند از قبیل آنتی بیوتیک‌ها، سایدروفورها و یا HCN که با ممانعت از رشد ریزسازواره‌های بیماریزا باعث تحریک رشد گیاه می‌شوند (رودریگز و فراگا ۹۹۹؛ رامشکومار و همکاران ۲۰۰۲). اثر مستقیم آن‌ها از راه‌های متعددی اتفاق می‌افتد از آن جمله، سنتز هورمون‌های گیاهی، تسهیل جذب عناصر غذایی، تثبیت نیتروژن، سنتز برخی آنزیم‌ها (از قبیل ACC deaminase) که سطح هورمون‌های گیاهی را تعدیل می‌کنند و همچنین انحلال فسفات معدنی و معدنی کردن فسفات آلی که برای گیاهان قابل استفاده می‌نماید (رودریگز و فراگا ۱۹۹۹؛ گوسوامی و همکاران ۲۰۱٦).

PGPRها را می‌توان به سه گروه تقسیم کرد: ۱) آن‌هایی که در چرخه های مواد معدنی و رشد گیاهان نقش دارند، تحت عنوان کود زیستی یا Biofertilizer.

www.SID.ir

Archive of SID

۲) آن‌هایی که در کنترل عوامل بیماریزا نقش دارند، تحت عنوان Biocontroler. ۳) آن‌هایی که با ترشح مواد محرک موجب رشد بیشتر و یا مقاومت به بیماری‌ها می‌شوند، تحت عنوان محرک زیستی یا Biostimulant.

PGPRهایی که در چرخه‌های مواد معدنی نقش دارند شامل: باکتری‌های همزیست تثبیت‌کننده نیتروژن و باکتریهای افزایش‌دهنده میزان فسفات قابل دسترس و سایر عناصر برای گیاه می‌باشد. در حال حاضر، این موارد موضوع بسیاری از تحقیقات کشاورزی نوین را به خود اختصاص داده است، و در بخش‌های پیشین مقاله به تفصیل در مورد آن صحبت شد.

با توجه به تاکید بر تولید هورمون‌های افزاینده رشد گیاه اعم از اکسین، سیتوکینین و جیبرلین توسط گروه‌های میکروبی خاص و همچنین تولید سایدروفورها، در این بخش سعی خواهد شد به این جنبه از ویژگی‌های PGPRای بیشتر اشاره شود.

اکسین و باکتری‌های مولد آن

تنظیم‌کنندگان رشد به موادی اطلاق می‌شود که در مقادیر اندک قادر به کنترل فرایندهای فیزیولوژیک می‌باشند. این ترکیبات به هر دو صورت طبیعی و سنتتیک وجود دارند و بر اساس ساختار شیمیایی و اثرات فیزیولوژیکی در پنج گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند. این گروه‌ها شامل اکسین‌ها، جیبرلین‌ها، سیتوکینین‌ها، اسید آبسیزیک‌ها و اتیلن می‌باشد (گیلک ۲۰۱۲؛ گوسوامی و همکاران ۲۰۱۶). اکسین‌ها ترکیباتی با هسته ایندولی[1] دارای ویژگی محرک رشدی گیاه هستند. نه تنها گیاهان بلکه میکروارگانیسم‌ها نیز قادر به تولید اکسین می‌باشند (اسپاپین و واندرلیدن، ۲۰۱۰). این هورمون در رشد و توسعه گیاه نقش اصلی دارد به صورتی‌که تغییرات در جهت رشد، رشد بخش هوایی و ریشه و انشعاب‌زایی آن مربوط به این هورمون می‌باشد (لیزر، ۲۰۰۱). هورمون اکسین به عنوان سازمان‌دهنده ریشه گیاه شناخته شده است و تقریباً در هر جنبه‌ای از رشد و توسعه گیاه هماهنگ‌کننده می‌باشد. نقش‌هایی که برای هورمون اکسین قائل هستند شامل تقسیم سلولی، طویل شدن و تمایز سلول، توسعه میوه و پیری می‌باشد (ساهاسرابودهه ۲۰۱۱). هورمون اکسین در ریشه‌زایی نقش مهمی دارد و سیستم ریشه گیاهان ظرفیت گیاه را برای جذب آب و عناصر غذایی تعیین می‌کند، همچنین ابزاری برای درک شرایط محیطی خاک است. از زمان تشریح هورمون اکسین، رابطه تنگاتنگی بین این هورمون و توسعه و رشد ریشه گیاهان بوده است.

ایندول استیک اسید (IAA) به عنوان اکسین اصلی در گیاهان اثرات عمیقی بر رشد و توسعه گیاهان دارد. گیاهان و برخی از پاتوژن‌های گیاهی قادر به تولید اکسین می‌باشند (ژائو ۲۰۱۰). این هورمون در برگ‌های جوان، بذرها و لپه‌ها، ساقه‌ها از طریق دِکربوکسیلاسیون یا انتقال آمین تریپتوفان سنتز می‌شود (ساچدو و همکاران ۲۰۰۹). پاتوژن‌های گیاهی نظیر *Agrobacterium* به منظور به خدمت گرفتن سلول‌های گیاهی برای تامین غذای خود، اکسین تولید می‌کنند. باکتری‌هایی نظیر *Pseudomonas* و *Agrobacterium* از مسیر iaaM/iaaH برای سنتز اکسین بهره می‌برند که شناخته‌شده‌ترین مسیر بیوشیمیایی در سنتز IAA می‌باشد. در این مسیر آنزیم تریپتوفان ۲- مونواکسیژناز[2](iaaM) تریپتوفان را به ایندول ۳-استامید (IAM) تبدیل نموده و در مرحله بعد به وسیله آنزیم هیدرولاز (iaaH) به IAA تبدیل می‌شود (ژائو ۲۰۱۰).

مدتهای طولانی است که سنتز هورمون اکسین به وسیله میکروارگانیسم‌ها شناخته شده است. این ویژگی به ویژه در باکتری‌هایی که با گیاهان واکنش‌های متقابل دارند به خوبی شناخته شده است و با برهم‌زدن تعادل

1 indole nucleus

2 tryptophan-2-monooxygenase

www.SID.ir

Archive of SID

اکسین گیاه می‌توانند بر رشد آن اثرگذار باشند. این موضوع در مورد پاتوژن‌های گیاهی نظیر *Agrobacterium* و *P. savastanoi* که به ترتیب عامل تومور و گال می‌باشند و همچنین باکتریهای PGPR نظیر *Azospirillum* شناخته شده است (اسپاپین و واندرلیدن ۲۰۱۰). در برخی موارد تولید مقادیر بالای اکسین توسط ریزوباکتری‌های ریزوسفری به جای تحریک رشد گیاه اثر بازدارندگی نشان داده است (گراول و همکاران، ۲۰۰۷). به همین خاطر در برخی موارد به ویژگی تجزیه IAA باکتری‌ها اشاره شده است. تصور می‌شود که بیش از ۸۰ درصد باکتری‌های جداسازی شده از ریزوسفر قادر به تولید IAA باشند. پیش‌ماده اصلی سنتز این هورمون، تریپتوفان می‌باشد و افزودن آن در محیط کشت اغلب باعث تولید بالای اکسین می‌شود (اسپاپین و واندرلیدن، ۲۰۱۰). تولید IAA از طریق متابولیسم L-Trp در گیاهان و خیلی از میکروارگانیسم‌های خاک از قبیل قارچ‌ها، جلبک‌ها و باکتری‌ها دنبال می‌شود. Indole-3-Pyruvic acid، Indole-3-Acetonirile و Indole-3-Acetaldehid پیش‌ماده‌های سنتز IAA می‌باشند. Indole-3-butyric acid نیز بیشتر در گیاهان مشاهده شده است. در تولید IAA از تریپتوفان، پنج مسیر وجود دارد که باکتری‌ها سه مسیر را مورد استفاده قرار می‌دهند. بیوسنتز تریپتوفان در نتیجه یک واکنش ۵ مرحله‌ای به کمک ژن-های *trp* از ماده کوریزمات (Chorismate) رخ می‌دهد. اپرون تریپتوفان (*trp* operon) که در خیلی از باکتری-ها حضور دارد شامل ۵ ژن ساختاری *trpE*، *trpD*، *trpC*، *trpB* و *trpA* می‌باشد که اولین بار در *E. coli* کشف شد (اسپاپین و واندرلیدن ۲۰۱۰).

مسیرهای سنتز اکسین غیروابسته به تریپتوفان نیز ارائه شده است که در گیاهان بیشتر مشخص شده است. نمونه این مسیر نیز با استفاده از تریپتوفان نشان‌دار در باکتری *A. brasilense* تایید شده است. علاوه بر موارد فوق تغییر و تبدیلاتی نیز بر اکسین تولیدی در گیاهان و باکتری‌ها مشاهده شده است، اعم از همراه شدن و اتصال به سایر مولکول‌ها نظیر قندها و اسیدهای آمینه (IAA-conjugates) یا تخریب و تجزیه آنها، که در برخی از موارد دلایل آن ناشناخته می‌باشد (اسپاپین و واندرلیدن ۲۰۱۰).

در سال‌های گذشته IAA تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها تنها به عنوان متابولیت ثانویه در نظر گرفته می‌شد (احتمالاً به خاطر تولید آن در فرایند سمیت‌زدایی تریپتوفان تجمع یافته در سلول)، اما با کشف مسیرهای دیگر سنتزی این ماده در باکتری‌ها، نقش‌های دیگری برای آن لحاظ شده است از جمله ایفای نقش به عنوان یک سیگنال برای تنظیم ژن در باکتری‌ها (اسپاپین و واندرلیدن ۲۰۱۰). باکتری‌ها وقتی در محیط طبیعی خود با گیاه در واکنش متقابل قرار می‌گیرند جدای از این موضوع که از نوع مفید یا بیماریزا باشند سیگنال‌هایی رد و بدل می‌کنند.

اکسین در خیلی از فرایندهای تشکیل گره در گیاهان لگوم به وسیله باکتری ریزوبیوم مشارکت دارد. تولید هورمون اکسین به وسیله ریزوباکتری‌ها می‌تواند تعادل اکسین گیاه را بر هم بزند. به طور کلی ریشه‌های گره‌دار در مقایسه با بدون گره دارای اکسین بیشتری هستند. همچنین باکتری‌های PGPR اثرات چندگانه‌ای (انحلال فسفات، فعالیت ACC deaminase، تثبیت نیتروژن و ...) بر بهبود رشد گیاهان دارند از جمله تولید اکسین که به دنبال تلقیح گیاهان با این باکتری‌ها تغییراتی در ساختار ریشه، از جمله تعداد تارهای کشنده و ریشه‌های جانبی رخ می‌دهد (اسپاپین و واندرلیدن ۲۰۱۰). با نگاهی به باکتری‌های بیماریزا و مفید، نقش اکسین در هر دوی آنها مشخص می‌شود اما این نقش در دو جهت معکوس الف) phytopathology و ب) phytostimulation می‌باشد.

سیستم ریشه گیاهان ظرفیت گیاه را برای جذب آب و عناصر غذایی تعیین می‌کند، همچنین ابزاری برای درک شرایط محیطی خاک است. هورمون اکسین از جمله

www.SID.ir

Archive of SID

عواملی می‌باشد که رابطه تنگاتنگی با توسعه و رشد ریشه گیاهان دارد. با این توضیح توسعه مطلوب ریشه برای تولید محصولاتی با عملکرد بهتر در کانون توجه تحقیقات مختلف قرار گرفته است. گرچه اغلب باکتری-های ریزوسفری دارای قابلیت تولید اکسین می‌باشند، اما از میان آنها می‌توان به جنس‌هایی نظیر *Rhizobium*، *Azotobacter*، *Azospirillum*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Enterobacter* و بعضاً گونه‌های بیماریزا همانند *Agrobacterium tumefaciens* اشاره داشت که دارای توان بالایی در تولید IAA هستند. گرچه محیط خاصی برای غربالگری باکتری‌های تولیدکننده اکسین ارائه نشده است، اما جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد اکسین معمولاً از روش‌های زیر دنبال می‌شود، برای این منظور محیط کشت‌های نیمه اختصاصی نظیر NF، King-B، Pikovskaya و نظایر آن را می‌توان برای جداسازی باکتری‌هایی از جنس *ازتوباکتر*، *آزوسپیریلوم*، *سودموناس* و دیگر باکتری‌ها استفاده نمود تا در مرحله بعد در محیط کشت مایع با بکارگیری معرف سالکوفسکی به بررسی تولید اکسین این جدایه‌ها پرداخت. در راهکار جایگزین نیز می‌توان از طریق پایش در پلیت با به‌کارگیری معرف‌های سالکوفسکی بعد از تهیه سری‌های رقت از نمونه‌های خاک (شکل ۷)، اقدام به این جداسازی نمود (ساریخانی ۲۰۱۵). علاوه بر سنجش در شرایط درون شیشه‌ای، در حضور گیاه و تحت شرایط گلخانه و مزرعه به بررسی تلقیح جدایه‌ها در ترغیب رشد گیاه (جوانه‌زنی، رشد و توسعه ریشه و بخش هوایی) پرداخته خواهد شد.

شکل ۷- کشت نقطه‌ای از جدایه‌های باکتریایی در محیط GP و افزودن معرف سالکوفسکی یا غشاء آغشته به این معرف بر سطح پلیت و پایش تشکیل رنگ ارغوانی در اطراف کلنی‌های مولد اکسین همانند استانداردهای IAA در سمت چپ تصویر (خوشرو و همکاران ۲۰۱۵).

سایدروفورها و باکتری‌های مولد آن

سایدروفورها ترکیباتی با وزن مولکولی پائین (اغلب کمتر از ۱ کیلودالتون) و با تمایل بالا نسبت به جذب آهن سه ظرفیتی (فریک) هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها و برخی از گیاهان برای مقابله با نامحلولی و عدم دسترسی آهن تولید می‌شوند. معمولاً سایدروفورهای میکروبی بر اساس طبیعت شیمیایی جایگاه هم‌آرایی اشان با آهن، به کاتکولیت‌ها (کاتکول‌ها یا فنولات‌ها)، هیدروکسامات‌ها و آلفاکربوکسیلیت تقسیم‌بندی می‌شوند. از آنجا که آهن یکی از عناصر مورد نیاز برای سلول‌های زنده محسوب می‌شود، سایدروفورهای تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها به ویژه باکتری‌های محرک رشد گیاه نقش حیاتی در تامین آهن برای گیاهان دارند و باعث سلامتی محصول و افزایش تولید آن می‌شوند. دخالت پروتئین‌های پذیرنده خاص در دیواره سلولی و آنزیم‌های ویژه برای احیاء آهن فریک به آهن فرو (شکل قابل جذب آهن) استفاده از سایدروفور را برای تولیدکنندگان آن و سایر موجودات مهیا می‌نماید. این ترکیبات علاوه بر نقش تغذیه‌ای در تامین آهن برای گیاهان، به دلیل خارج ساختن آهن از دسترس عوامل بیماریزا دارای قابلیت کنترل زیستی نیز می‌باشند (گیلک ۲۰۱۲؛ گوسوامی و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران ۲۰۱۶). ریزوسفر محیط پویایی است که گروه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها را در خود جای داده است. شناسایی و جداسازی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده سایدروفور و بهره‌گیری از آنها در تامین آهن مورد نیاز گیاه، راه‌حل مناسبی برای برطرف سازی کمبود آهن محصولات کشت شده به ویژه در خاک‌های آهکی خواهد بود، علاوه بر آن از نقش آنها به عنوان عوامل کنترل‌گر زیستی نبایستی غافل شد. روش مرسوم در جداسازی تولیدکنندگان سایدروفور بهره‌گیری از کروم‌آزرول-اس (CAS) می‌باشد که سایدروفور تولیدی به عنوان عامل کلات‌کننده آهن فریک قادر به تشکیل کمپلکس با آهن موجود در ترکیب CAS خواهد بود و منجر به پیدایش تغییرات رنگی در سوبسترا خواهد شد (شین و همکاران ۲۰۰۱).

آهن در طبیعت به دو شکل فرو و فریک یافت می‌شود، شکل اکسایش‌یافته آن شکل غالب آهن در طبیعت بوده اما آهن دوظرفیتی شکل قابل جذب آن می‌باشد. با این که این عنصر چهارمین عنصر فراوان در پوسته زمین را به خود اختصاص می‌دهد اما کمبود آهن در نزدیک به ۳۰ درصد محصولات دنیا مشاهده می‌شود. آهن یکی از عناصر ضروری برای حیات محسوب می‌شود و همه موجودات زنده برای فعالیت متابولیکی و رشد نیاز به آهن دارند. آهن به عنوان کوفاکتور حدود ۱۴۰ آنزیم عمل کرده و در سنتز DNA، کلروفیل، تیلاکوئید و توسعه کلروپلاست نیز نقش دارد. برای رشد بهینه حداقل غلظتی برابر ۱ میکرومولار مورد نیاز است ولی این غلظت برای موجودات مختلف فرق می‌کند (شارما و همکاران ۲۰۰۳).

خیلی از میکروارگانیسم‌ها برای انحلال و استفاده از آهن فریک از سیستم کارامدی استفاده می‌کنند. آنها با سنتز عوامل کلات کننده Fe^{3+}، نیاز خود را تامین می‌کنند. در واقع سایدروفورها و فیتوسایدروفورها (سایدروفورهای گیاهی) متابولیت‌های ثانویه هستند و محصول القاء ژن‌هایی می‌باشند که در شرایط حضور Fe^{3+} و تا حدودی شرایط کمبود روی، مس و منگنز ابراز و تولید می‌شوند. سنتز سایدروفورها به وسیله غلظت آهن در محیط تنظیم می‌شود و تولید آنها تحت شرایط غلظت بالای آهن محدود می‌شود. تولید آنها از مسیرهای متابولیکی شناخته شده و کوتاهی صورت می‌گیرد (پرزمیراندا و همکاران ۲۰۰۷).

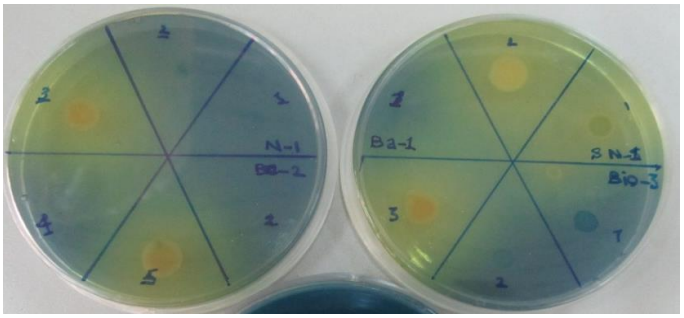
مرسوم‌ترین روش شناسایی تولید سایدروفور روش فراگیر CAS می‌باشد. اساس این روش بر مبنای رقابت بر سر آهن (Fe^{3+}) موجود در کمپلکس رنگی CAS و سایدروفور می‌باشد. سایدروفور تولیدی قادر به تشکیل پیوند با آهن فریک موجود در این ترکیب بوده و کمپلکسی را تشکیل می‌دهد و باعث تغییر رنگ ماده فوق می‌شود (مانینن و ماتیلا ساندهلم ۱۹۹۴; ماچوکا و میلاگرس ۲۰۰۳). در این روش مطابق شکل ۸ کمپلکس CAS دارای آهن بعد از کلات شدن آهن به وسیله سایدروفور از آبی به نارنجی تغییر رنگ می‌دهد. اساس روش CAS اگار را می‌توان به شکل زیر خلاصه نمود (شین و همکاران ۲۰۰۱).

$$FeCAS\ (blue) + L\ (Siderophore) \longrightarrow FeL + CAS\ (orange/yellow)$$

روش معرفی شده (CAS-assay) توسط شوین و نایلند می‌تواند سایدروفور کل را بدون توجه به ماهیت شیمیایی سایدروفور مشخص سازد و به دو شکل قابل انجام است (ماچوکا و میلاگرس، ۲۰۰۳). می‌توان تولید سایدروفور را در محیط جامد و با استفاده از این ماده در پلیت بررسی نمود (شکل ۸) یا در محیط مایع سنجش را انجام داد. قابل ذکر می‌باشد که روش استفاده از محیط جامد کیفی بوده و تولید سایدروفور در این محیط بیشتر با عباراتی چون قوی، ضعیف برای نشان دادن قطر هاله رنگی در اطراف کلنی میکروبی استفاده می‌شود، در حالی‌که روش محیط مایع تقریباً کمّی می‌باشد و از محلول رویی کشت میکروبی برای این منظور استفاده می‌شود (خوشرو و همکاران ۲۰۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۸- پیدایش رنگ زرد یا نارنجی در جدایه‌های باکتریایی مولد سایدروفور در محیط CAS-agar (ساریخانی و انصاری ۲۰۱۵)

قارچ‌های میکوریز

آشنایی بشر با قارچ‌های میکوریز (۱۸۸۵) در مقایسه با باکتری‌های حل‌کننده فسفات (۱۹۰۳) به بیش از ۱۳۰ سال پیش باز می‌گردد، زمانی‌که فرانک اولین بار این واژه را برای همزیستی ریشه گیاهان و قارچ به کار برد. قارچ‌های مشارکت‌کننده در این همزیستی در یک تقسیم‌بندی کلی به گروه‌های اندومیکوریز (AM[1]، اورکید، اریکوئید) و اکتومیکوریز (آربوتوئید، مونوتروپوئید و EM[2]) تقسیم بندی می‌شوند. تفاوت عمده این دو گروه علاوه بر شکل و مورفولوژی همزیستی، تفاوت در نوع گیاهان میزبان، نوع قارچ‌های مشارکت‌کننده و اندام‌های خاص قارچی تشکیل شده در این همزیستی می‌باشد. گرچه اغلب قارچ‌های میکوریز مشارکت‌کننده در همزیستی (متعلق به آسکومیست‌ها، زیگومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها) با گیاهان میزبان مختلف به راحتی در محیط‌های کشت آزمایشگاهی تکثیر و استفاده می‌شوند اما قارچ‌های AM (متعلق به گلومرومایست) که اغلب با گیاهان زراعی تشکیل همزیستی می‌دهند، در این شرایط قابل تکثیر نیستند (اسمیت و رید ۲۰۰۸; پائول ۲۰۰۷).

میکوریز از مهم‌ترین و گسترده‌ترین ارتباط-های همزیستی در سلسله گیاهی است به طوری که اکثر گیاهان حداقل یکی از تیپ‌های میکوریزی را دارا هستند. بنابراین همزیستی میکوریزی نوع آربوسکولار محدوده وسیعی از گیاهان زراعی را شامل می‌شود. قارچ در حالی‌که به درون پوست ریشه گیاه نفوذ می‌کند از گیاه میزبان کربن دریافت می‌کند و در مقابل فسفر و سایر عناصر معدنی را به وسیله هیف‌های گسترده خود در خاک جذب و در اختیار گیاه قرار می‌دهد. همچنین سایر اثرات مفید این همزیستی شامل افزایش مقاومت گیاه به شوری، خشکی، عوامل بیماریزا می‌باشد که گیاه از آن بهره‌مند می‌شود (کویده و موس ۲۰۰٤). گستردگی هیف قارچی تا فواصل دورتر از ریشه، همچنین ترشح آنزیم خارج سلولی فسفاتاز در هیفوسفر (فاگریا ۲۰۰۹). بعلاوه حضور ژن یا ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده فسفات از جمله عوامل دیگری است که در توضیح رفتار قارچ‌های میکوریز عنوان می‌شود. نقش بارز قارچ‌های میکوریز در آزادسازی فسفر باعث شده است تا به عنوان کودهای زیستی همواره مورد توجه باشند (کویده و موس ۲۰۰٤).

اولین گام در یک برنامه تولید مایه تلقیح قارچی، جداسازی و دسترسی به یک ایزوله توانمند قارچی است که دارای دو شرط اولیه باشد یکی اینکه توانایی بالایی در برقرای همزیستی با گیاه میزبان و ایجاد کلنیزاسیون داشته باشد و دوم اینکه موثر واقع شود و بتواند در فراهمی عناصر غذایی و ترغیب و

[1] Arbuscular Mycorrhiza
[2] Ectomycorrhiza

www.SID.ir

Archive of SID

بهبود رشد گیاه توانمند باشد. ایزوله‌های به دست آمده بایستی در آزمایش‌های گلدانی مورد سنجش قرار بگیرند و در ادامه این آزمایش‌ها با آزمایش‌های مزرعه-ای و در شرایط واقعی دنبال شود به شکلی که بتوان بهترین ایزوله را برای شرایط تعریف شده و اعمال شده برای استفاده معرفی نمود (ساریخانی و ابراهیمی ۲۰۱۱؛ علی‌اصغرزاد و همکاران ۲۰۰۱). بایستی در نظر داشت که به هر حال استفاده از قارچهای AM به عنوان کود زیستی فسفاته با محدودیت‌هایی مواجه است، اول آنکه این قارچهای بیوتروف همزیست اجباری بوده و در شرایط درون شیشه‌ای و آزمایشگاهی بدون حضور گیاه قابل تکثیر و کشت نمی‌باشند و برای تکثیر آنها حضور گیاه میزبان ضروری می‌باشد (علی‌اصغرزاد و رضایی ۲۰۱۱). همچنین در اغلب آزمایشات مشخص شده است در شرایطی که خاک دارای میزان کافی فسفر قابل استفاده باشد این قارچها قادر به ایجاد کلنیزاسیون مناسب نمی‌باشند و این همزیستی در چنین شرایطی موفقیت آمیز نیست. اما برخلاف قارچهای AM که تکثیر آنها با مشکلاتی مواجه است، قارچهای EM از نوع ارگانوتروف بوده و به راحتی در محیط‌های کشت قابل تکثیر و استفاده می‌باشند (ساریخانی و ابراهیمی ۲۰۱۱).

در دهه‌های اخیر تکنیک‌های کشت زیادی برای تهیه مایه تلقیح قارچهای AM توسعه یافته است. تکنیک‌هایی که بر مبنای استفاده از خاک یا بستر و بدون آن شکل گرفته است (شکل ۹). نیاز به تکنیک‌های جدید در تکثیر این دسته از قارچها ناشی از توجه به آنها در حیطه کشاورزی، باغبانی و جنگل می‌باشد. اما به طور کلی روش‌های تولید و تکثیر مایه تلقیح قارچی تا به امروز در سه روش خلاصه می‌شوند که توجه خوانندگان به مطالعه مقاله ساریخانی و ابراهیمی (۲۰۱۱) جلب می‌شود.

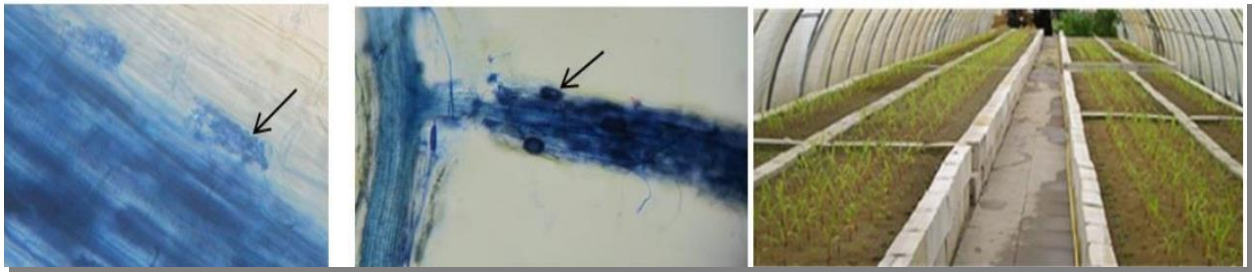
خوشبختانه پس از کشف و شناسایی قارچ شبه میکوریز *Piriformospora indica* از بیابانهای کشور هند توسط وارما در سال ۱۹۹۸، استفاده از این قارچ میکوریزی محرک رشد گیاه، با سرعت چشمگیری روبه‌افزایش است. استفاده از این قارچ که متعلق به بازیدیومیستها است در شرایط استرس محیطی و غذایی همراه با پیامد و اثرات مثبت آن بوده‌است. برتریهای این قارچ در مقایسه با قارچ AM نظیر غیرهمزیست اجباری بودن و راحتی تکثیر آن در محیط کشت، و قابلیت کلنیزه نمودن اغلب گیاهان باعث شده است تا کابرد آن به طور فزاینده‌ای افزایش یابد. (وارما و همکاران ۲۰۱۲).

اثربخشی کودهای زیستی

پرمناقشه‌ترین بحث در مورد کودهای زیستی در خصوص اثربخشی آنهاست که امروزه تحقیق، تولید و استفاده از آن را تحت تأثیر قرار داده است. به طور کلی امری که بیشتر در مورد کودهای زیستی به چشم می‌خورد، ناهماهنگی نتایج حاصل از کاربرد آنهاست. بدین معنی که نتیجه کاربرد یک کود زیستی خاص بر روی یک گیاه مشخص در دو نقطه متفاوت، یکسان نخواهد بود. دلیل این امر ماهیت زنده این کودها و تأثیر شرایط محیطی، خاکی، گونه‌های گیاهی و میکروارگانیسم های بومی خاک بر کارایی آن می‌باشد. بدیهی است عدم اثربخشی یک کود زیستی در شرایط خاص نمی‌تواند نشانه عدم اثربخشی آن در سایر شرایط نیز باشد. آنچه که در مورد کودهای زیستی از اهمیت زیادی برخوردار است این نکته است که اثربخشی آنها بیشتر از آنکه به ماهیت آن بستگی داشته باشد وابسته به کیفیت است. به عبارت دیگر چنانچه میکروارگانیسم بکار رفته در تولید کود زیستی، مراحل جداسازی، غربالگری، زیست سنجی و آزمایشات اثربخشی را به‌درستی طی نکرده باشد، چنانچه حتی در جمعیت کافی در ترکیب کود زیستی وجود داشته باشد نیز اثربخش نخواهد بود (اسدی رحمانی و همکاران ۲۰۱۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۹- تکثیر قارچ میکوریز در بستر کشت با گیاه میزبان (ذرت) و اندامک‌های قارچی ناشی از کلنیزاسیون قارچی در ریشه (کویده و موس ۲۰۰۴).

محصولات مختلف از جمله کودهای زیستی، اکنون در حال تولید و استفاده در جهت بهبود حاصلخیزی خاک و افزایش عملکرد محصولات کشاورزی می باشند. اینکه چگونه این مواد مختلف را باید در سیستم های مختلف زراعی استفاده نمود تا حاصلخیزی خاک افزایش پیدا کند مورد توجه محققین و کشاورزان است. یافتن روابط بین شاخص‌های بالقوه و تولید محصول، پایداری دراز مدت و تاثیرات زیست محیطی بسیار مشکل است. قسمتی از این دشواری به دلیل محدودیت شناخت چگونگی روابط بین این مواد و اثر آنها بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک است. غیر یکنواختی مکانی و زمانی خاکها و تنوع اقلیمی و تاثیر این عوامل بر ویژگی های مواد محرک رشد از عوامل مهم دیگری هستند که مدیریت این مواد را قدری دشوار می نمایند.

در بحث کارایی کودهای زیستی در کشاورزی اگرچه نتایج مثبتی توسط آزمایشات گلدانی و گلخانه‌ای حاصل شده است ولی پیاده‌سازی تکنولوژی‌های مدیریت تلفیقی عناصر غذایی توسط کشاورزان در سطح مزرعه لازم و ضروری است (بهومیک و داس ۲۰۱۸). به عنوان مثال حدود ٤٠ درصد از مناطق زیر کشت حبوبات، جمعیت کم تا متوسطی از ریزوبیوم بومی دارند و در این شرایط تولید حبوبات می‌تواند از طریق تلقیح بذر با کود زیستی ریزوبیومی کم هزینه، افزایش یابد. کودهای زیستی مکمل تغذیه فسفر در کشاورزی می‌باشند و در صورتی که بتوانیم قابلیت دسترسی به فسفر تثبیت شده را برای گیاهان زراعی افزایش دهیم، می‌توانیم در صرفه‌جویی هزینه کشاورزی و ارز خارجی به موفقیت برسیم. کمیت و کیفیت پایین کود زیستی یکی از محدودیت های اصلی در محبوبیت کودهای زیستی می‌باشد. همچنین همکاری نزدیک بین متخصصان شیمی، میکروبیولوژی و زراعت مورد نیاز است تا استفاده از نهاده‌های غیرزیستی و زیستی را تسهیل نمایند در حالی که از حفظ کشاورزی پایدار نیز اطمینان حاصل شود (بهومیک و داس ۲۰۱۸).

روی و همکاران (۲۰۰٦) در گزارش تغذیه گیاهی و کوددهی فائو برای امنیت غذایی در مورد کودهای زیستی تثبیت کننده نیتروژن بیان نمودند که تلقیح با *ریزوبیوم* برای حبوبات، دانه های روغنی و گیاهان علوفه‌ای توصیه می‌شود و بسته به شرایط اقلیم –خاک و کارایی سویه ریزوبیوم، افزایش عملکرد ۱۰ تا ٦۰ درصدی را به همراه خواهد داشت. عملکرد دانه در کرتهای تلقیح شده با *ازتوباکتر* با عملکرد دانه در کرتهای با کاربرد ۲۰-۳۵ کیلوگرم در هکتار نیتروژن مشابه بود. *آزوسپیریلوم* یکی دیگر از باکتری های تثبیت‌کننده نیتروژن می‌باشد که اطراف ریشه گراس‌ها پراکنده است. این باکتری توانایی تثبیت نیتروژن به

www.SID.ir

Archive of SID

میزان بیشتری در ارتباط با ریشه گیاهان دارد. جلبک سبزآبی (سیانوباکتر) عمدتاً به عنوان کود زیستی در تولید برنج غرقابی استفاده می‌شود. گونه‌های مختلف سیانوباکتری مثل *نوستوک* و *آنابنا* توانایی تامین ۳۰-۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار را در برنج غرقاب دارند. پاسخ گیاهان تلقیح شده با کودهای زیستی فسفاتی به صورت متغیر گزارش شده است ولی به طور متوسط حدود ۱۰ درصد می‌باشد. در بعضی از کشورها مثل هندوستان، کودهای زیستی حل کننده فسفات بعد از مایه تلقیح ریزوبیوم، در رتبه دوم اهمیت قرار دارند (روی و همکاران ۲۰۰۶).

در جدول ۳ به بخشی از نتایج کاربرد کودهای زیستی مختلف یا باکتریها و قارچهای جداسازی شده از مناطق مختلف پرداخته شده است. بایستی عنوان نمود که این نتایج تنها بخشی و گزیده‌ای از این دست مطالعات می‌باشد که آورده شده است.

جدول ۳- مهمترین مطالعات مربوط به کاربرد کودهای زیستی در گیاهان زراعی، دارویی و کشت مخلوط در ایران

نوع کود زیستی	گیاه زراعی	نتیجه	منبع
سودوموناس	گوجه‌فرنگی	عملکرد، اندازه میوه، محتوای ویتامین ث، لیکوپن، درصد نیتروژن، فسفر و پتاسیم افزایش یافت	شیخ علیپور و همکاران (۲۰۱۷)
(*Azospirillum* AC46I و *P. fluorescens* Chao) و قارچ میکوریز *G. intraradices*	پیاز خوراکی	عملکرد بیش از دو برابر افزایش یافته است	عزتی کنده و همکاران (۲۰۱۹)
Sinorhizobium meliloti کود زیستی پتابارور۲	شنبلیله	افزایش اکثر صفات رویشی و در نتیجه عملکرد شاخساره	منبری و همکاران، ۲۰۱۸
باکتریهای *S. meliloti* و *P. fluorescens*	شنبلیله	سطح برگ، وزن تر و خشک قسمت هوایی و کارآیی مصرف آب افزایش یافت	شرقی و همکاران (۲۰۱۸)
کود زیستی برد هیوم،	سیب زمینی	افزایش عملکرد غده و درآمد ناخالص	(مهدوی و همکاران ۲۰۱۵)
کود زیستی برد هیوم،	سیب زمینی	کاهش غلظت نیترات در غده سیب زمینی	امینی و همکاران (۲۰۱۷)
نیتروکسین و بیوسوپرفسفات	لوبیا چیتی	افزایش صفات رشدی و عملکرد دانه	اعلمی میلانی و همکاران (۲۰۱۶)
نیتراژین و نیتروکسین	ذرت (*Zea mays* L.)	تولید عملکرد مناسب و بهبود کارایی جذب نیتروژن	حمزه یی و سرمدی نایبی (۲۰۱۱)
کود زیستی نیتروکسین و کود زیستی فسفاته (حاوی باسیلوس)	ذرت	افزایش عملکرد دانه	عیدی زاده و همکاران (۲۰۱۲)
کودهای زیستی نیتراژین، بارور ۲	ذرت	افزایش عملکرد، پروتئین، درصد فسفر و پتاسیم و درصد آهن دانه	جوانمرد و همکاران (۲۰۱۶)
نیتروکارا و تلقیح با تیوباسیلوس	کلزا	افزایش عملکرد و اجزای عملکرد کلزا	جشنی و همکاران (۲۰۱۴)
نیتروکسین و بارور-۲	کلزا	افزایش تعداد خورجین در متر مربع و عملکرد دانه	منجزی و همکاران (۲۰۱۴)
کود زیستی نیتروکارا	گندم	افزایش عملکرد دانه	حجتی پور و همکاران (۲۰۱۳)
(ازتوباکتر و آزوسپیریلوم) و حل کننده فسفات (سودوموناس و	گندم	افزایش عملکرد دانه	مهتدی و همکاران (۲۰۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID

نوع کود زیستی	گیاه زراعی	نتیجه	منبع
انتروباکتر)			
نیتروکسین، سوپر نیتروپلاس	گندم	تولید بیشترین عملکرد را و کاهش مصرف کودهای شیمیایی	توکلی و جلالی (۲۰۱۶).
کاربرد تلفیقی کود فسفره و میکوریز	گندم	تولید بیشترین عملکرد دانه و پروتئین	رستمی و همکاران (۲۰۱۷)
باکتری باسیلوس، سودوموناس و قارچ تریکودرما	نخود	عملکرد و کیفیت دانه را افزایش داده و مصرف کودهای شیمیایی را کاهش داد	محمدی و همکاران (۲۰۱۰)
ازتوبارور ۱ و فسفات بارور ۲	بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.)	کاربرد کود زیستی در ترکیب با ۵۰ درصد کود شیمیایی، بیشترین رشد و عملکرد سرشاخه را باعث شد	امینی و همکاران (۲۰۱۸)
Azospirillum،*Pseudomonas* و *Azotobacter*	انیسون (*Pimpinella anisum* L.)	افزایش درصد اسانس، عملکرد اسانس و درصد آنتول	خالص رو و همکاران (۲۰۱۲).
فسفات بارور ۲	انیسون	بیشترین درصد اسانس در دانه و میزان آنتول در اسانس با دو بار مصرف کود زیستی فسفره حاصل شد	درزی و همکاران (۲۰۱۳)
نیتروکسین + بیوسولفور + فسفاته بارور ۲	بادرشبو	بیشترین عملکرد اسانس در تیمار نیتروکسین حاصل گردید	رحیم زاده و همکاران (۲۰۱۱).
نیتروکسین و بیوفسفر	بادرشبو	بیشترین درصد و عملکرد اسانس، از تیمار ترکیب نیتروکسین و بیوفسفر حاصل گردید	کریم زاده اصل و همکاران (۲۰۱٤)
تریکودرما (*T. hamatum* و *T. harzianum*،*T. viridae*)	ریحان (*Ocimum basiilicum* L.)	*T. harzianum* افزایش بیشتری در وزن خشک اندام هوایی و صفات رشدی را باعث شد	متقیان و همکاران (۲۰۱۳)
ازتوباکتر (*A. paspali*) آزوسپیریلوم (*A. brasilense*) و قارچ همزیست میکوریزا (*G. intraradaices*)	سیاهدانه (*Nigella sativa* L.)	بیشترین سرعت رشد محصول در تیمار ترکیبی آزوسپیریلوم و قارچ مشاهده شد	(خرم دل و همکاران ۲۰۰۸).
قارچ شبه میکوریز *P. indica*	رازیانه	بیشترین عملکرد و تعداد چتر در بوته در تیمار تلقیح با قارچ شبه میکوریز حاصل شد	جمشیدی و همکاران (۲۰۱٤)
نیتروکسین و فسفات بارور ۲	کدوی تخم کاغذی (*Cucurbita pepo* L.)	کودهای زیستی در تلفیق با ۵۰ ٪ کود شیمیایی بیشترین عملکرد دانه و میوه را داشتند	حبیبی و همکاران (۲۰۱۳)
شبه میکوریزا (*P. indica*) و تریکودرما (*T. tomentosum*)	ریحان	بهبود رشد و عملکرد این گیاه	فقیه عبدالهی و همکاران (۲۰۱۵)
A. chroocccum, *A. lipoferum*، و *P. putida*)	گندم	بیشترین عملکرد دانه از تیمار تلقیح بذر با باکتری ازتوباکتر کروکوم بدست آمد	چمانی و همکاران (۲۰۱۲)
قارچ *G. intraradices* و باکتری *P. fluorescens*	گندم	میزان کلروفیل برگ پرچم و عملکرد افزایش یافت	سادات و همکاران (۲۰۱۰)
(فسفات بارور ۲ + ازتوبارور)	کشت مخلوط باقلا(*Vicia faba* L.) و گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)	کاربرد تلقیقی مقادیر کاهش یافته کود شیمیایی + کود زیستی بیشترین عملکرد و کیفیت گلرنگ را در تیمار مخلوط داشت	سعیدی و همکاران (۲۰۱۸)
(فسفات بارور ۲+ ازتوبارور۱)	زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) در کشت مخلوط با باقلا	کشت مخلوط نواری، عملکرد دانه و اسانس در تیمار کود زیستی + ۵۰ درصد کود شیمیایی با تیمار ۱۰۰ درصد کود شیمیایی تفاوت معنی	(امینی و همکاران ۲۰۱٦، سخاوی و همکاران ۲۰۱۷،

www.SID.ir

Archive of SID

نوع کود زیستی	گیاه زراعی	نتیجه	منبع
		داری نداشت	۲۰۱۸).
فسفات بارور ۲+ ازتوبارور۱	بادرشبو در کشت مخلوط با باقلا	عملکرد سرشاخه در تیمار کود زیستی + ۵۰ درصد کود شیمیایی با تیمار ۱۰۰ درصد کود شیمیایی تفاوت معنی داری نداشت. کاربرد کودهای زیستی بر ترکیب شیمیایی اسانس تاثیر داشت.	(وفادار ینگجه و همکاران ۲۰۱۷؛ a , ۲۰۱۸b؛ ۲۰۱۹).
(نیتراژین+ بارور ۲)	کشت مخلوط ذرت با ارقام مختلف لوبیا	کشت مخلوط ذرت با رقم گلی لوبیا قرمز با تیمار کاربرد کود زیستی بیشترین سودمندی نسبی را داشت	دباغ محمدی نسب و همکاران (۲۰۱۵)
فسفات بارور ۲	کشت مخلوط ارزن (*Panicum miliaceum* L.) و لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* L.)	اثر کود زیستی بر کارآیی مصرف آب، کارآیی جذب، کارآیی فیزیولوژیک و کارآیی مصرف نیتروژن معنی دار بود.	خاکی نجف آبادی و همکاران (۲۰۱۷)
کود زیستی بارور ۲	کشت مخلوط ذرت و خلر (*Lathryrus sativas* L.)	مصرف ۵۰ درصد فسفر زیستی + ۵۰ درصد فسفر شیمیایی بهترین عملکرد و سودمندی را داشت	نقی زاده و همکاران (۲۰۱۲)
(*G. mosseae*)، (*P. indica*)، (*B. lentus* + *P. putida*	مخلوط آفتابگردان با شبدر	جذب عناصر و عملکرد دانه آفتاب گردان افزایش یافت	زرین جوب و همکاران (۲۰۱۲)
نیتروکسین (حاوی باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم)	کشت مخلوط ذرت با لگوم های مختلف	بیشترین عملکرد کل علوفه خشک و پروتئین خام علوفه به تیمار ذرت تلقیح شده با نیتروکسین تعلق داشت	جوانمرد و همکاران (۲۰۱۸)
یتروکسین و فسفات بارور ۲	کشت مخلوط یونجه (*Medicago sativa* L.) و رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.)	بیشترین عملکرد علوفه خشک یونجه از تیمار کود زیستی+ ۵۰ ٪ کود شیمیایی و بیشترین ماده خشک، عملکرد اسانس و میزان آنتول رازیانه با دریافت کود تلفیقی حاصل شد	آقابابادستجردی و همکاران (۲۰۱۷)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- برخی از مطالعات دانشگاهی مهم منتج به دستیابی به سویه‌های کارآمد میکروبی (ساریخانی، ۲۰۱۵)

دانشگاه	باکتری‌های محرک رشد	منبع (پایان‌نامه/مقاله)
تبریز	حل کننده‌های فسفات (سودوموناس پوتیدا، سودوموناس فلورسنس)	(راثی‌پور و علی‌اصغرزاد، ۲۰۰۵)
	سودوموناس فلورسنس	(فرج زاده، ۲۰۰۹)
	(چندین جدایه *سودوموناس*)	(نوبهار و همکاران، ۲۰۱۷)
	(چندین جدایه *ازتوباکتر*)	(ابراهیمی و همکاران، ۲۰۱۸)
	میکوریز آربوسکولار (*گلوموس موسه، گلوموس اینترارادیسز، گلوموس اتونیکاتوم*)	(علی‌اصغرزاد و همکاران، ۲۰۰۱)
	ازتوباکتر	(فرجزاده و همکاران، ۲۰۱۲)
	آزادکننده‌های پتاسیم (*باسیلوس مگاتریوم*)	(کشاورز زرجانی و همکاران، ۲۰۱۳)
	(چندین جدایه سودوموناس)	(ساریخانی و همکاران، ۲۰۱۶)
تربیت مدرس	تیوباسیلوس	(کریمی‌نیا، ۱۹۹۷)
	سودوموناس	(رسولی صدقیانی و همکاران، ۲۰۰۸)
تهران	*آزوسپیریلوم*	(علیخانی و همکاران، ۲۰۰۵)
	باکتری‌های PGPR	(سرچشمه‌پور و همکاران، ۲۰۰۹)
	ریزوبیوم	(علیخانی، ۲۰۱۱) (سلطانی طولارود و همکاران، ۲۰۱۳) (سقفی و همکاران، ۲۰۱۴)
شهرکرد	*ازتوباکتر کروکوکوم*	(رجائی و همکاران، ۲۰۰۷)
صنعتی اصفهان	*ریزوبیوم*	(باقری مفیدی و همکاران، ۲۰۰۶) (قربانی سینی، ۲۰۱۱)
	سینوریزوبیوم	(طالبی بداف و همکاران، ۲۰۰۸)
فردوسی مشهد	*ریزوبیوم لگومینوزاروم*	(غزائیان و همکاران، ۲۰۰۴)
	سینوریزوبیوم ملیلوتی	(ابوالحسنی زراعتکار و همکاران، ۲۰۰۸ و ۲۰۱۰)
	سودوموناس	(طهماسبی و همکاران، ۲۰۱۴)
گرگان	*آزوسپیریلوم*	(رجب‌زاده، ۲۰۰۹) (محمدیان مغامیر، ۲۰۱۰)
	باکتری‌های سیلیکاتی (*باسیلوس سیرکولنس*)	(علیدوست چمندانی و همکاران، ۲۰۱۱)
	ازتوباکتر	(دولتی و همکاران، ۲۰۱۲)
	سودوموناس	(مقامی و همکاران، ۲۰۱۳)
ولیعصر رفسنجان	*سودوموناس*	(حسنی، ۲۰۱۰)

*: منابع ذکر شده در جدول از منبع ساریخانی، ۲۰۱۵ می‌باشد و به منظور جلوگیری از طولانی شدن مقاله از آوردن آنها در بخش منابع پایانی پرهیز شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری و دورنمای تحقیقات و استراتژیهای آینده

با نگاهی به تاریخ عرضه اولین کود زیستی داخلی که نزدیک ۲۰ سال از آن می‌گذرد مشاهده می‌شود که مطالعات پراکنده‌ای در بخش‌های مختلف کشور توسط محققین دانشگاهی و مراکز تحقیقاتی جهت جداسازی، شناسایی و دستیابی به گونه‌های میکروبی کارآمد انجام گرفته است. اما در این میان شاید هدفمندترین مطالعات که در نهایت به عرضه محصولات زیستی در کشور منجر شده است به فعالیت‌های موسسه تحقیقات خاک و آب بتوان اشاره نمود که بسیاری از کودهای زیستی مورد استفاده کشور حاصل عرضه دانش فنی این کودها به بخش خصوصی و استفاده شرکت‌ها از آن در تولید تجاری است. از جمله دانش‌های فنی عرضه شده در حیطه کودهای زیستی می‌توان به مایه تلقیح سویا، لوبیا، نخود، باکتری‌های ریزوبیوم، باکتری‌های ریشه‌زا، باکتری‌های حل‌کننده فسفر، *ازتوباکتر*، *تیوباسیلوس* و همچنین زادمایه قارچی میکوریز به روش کشت درون شیشه‌ای اشاره داشت. حضور و مشارکت دانشگاه تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در یکی دو مورد از موارد فوق به چشم می‌خورد همچنین جهاد دانشگاهی در کار تحقیقاتی و تولید کود زیستی فسفاته بارور۲ نقش موثری داشته است (بشارتی و همکاران ۲۰۱۷؛ اسدی و همکاران ۲۰۱۳). گرچه فعالیت در این حیطه، جزء مرزهای تعیین شده برای رشته خاص دانشگاهی نیست و علاقمندان مربوط به آن از شاخه‌های مختلف علم بدان ورود پیدا کرده‌اند اما متخصصین بیولوژی و میکروبیولوژی خاک و همچنین میکروبیولوژیست‌های فعال در عرصه کشاورزی جلوداران این بخش هستند. با نگاهی به فعالیت متخصصین میکروبیولوژی خاک در دانشگاه‌های کشور، به جداسازی، شناسایی و معرفی برخی از سویه‌های میکروبی مفید برخورد می‌کنیم که تعدادی از آنها در همان فاز ابتدایی باقی مانده‌اند و بخشی نیز به لحاظ عمومیت استفاده در تحقیقات مختلف بیشتر مورد اقبال و توجه محققان قرار گرفته‌اند ولیکن به تولید و استفاده تجاری نرسیده‌اند. از این میان به موارد اشاره شده در جدول ٤ می‌توان اشاره نمود. البته بایستی عنوان نمود که مطالب قابل مشاهده در این جدول، تمام پتانسیل موجود در کشور نیست و اطلاعاتی است که نویسندگان مقاله به آنها دسترسی داشته‌اند یا از طریق تماس‌های شخصی در جریان آنها قرار گرفته‌اند.

در پایان موارد زیر را می‌توان به عنوان دورنمای تحقیقات و استراتژیهای آینده برشمرد:

جداسازی و شناسایی پتانسیل‌های میکروبی مناطق مختلف (اعم از تثبیت‌کنندگان نیتروژن، حل‌کنندگان فسفر، آزادکنندگان پتاسیم، حل‌کنندگان عناصر میکرو از قبیل آهن و روی، مولدین هورمونهای رشد گیاه و قارچهای میکوریز و شبه میکوریز) و ارزیابی کارایی آنها در حضور محصولات مختلف تحت شرایط متفاوت خاک و اقلیم گوناگون و دستیابی به بهترین ترکیب سویه میکروبی/گیاه/خاک و اقلیم.

بهینه‌سازی سویه‌های میکروبی از طریق روش‌های زیست‌فناوری که در این خصوص تولید و ارائه زادمایه‌های میکروبی با روش‌های نوین می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. بکارگیری روش استریل‌سازی به کمک اشعه گاما در مورد کودهای زیستی مبتنی بر حامل جامد، جهت استقرار نمودن سویه میکروبی بر روی حامل‌های استریل.

توجه بر ماندگاری و زنده‌مانی سویه‌های میکروبی در فرمولاسیون‌های مختلف میکروبی (مایع، جامد، گرانوله، کپسوله شده).

www.SID.ir

Archive of SID

استخدام و بکارگیری متخصصین حوزه میکروبیولوژی بویژه محققان میکروبیولوژی خاک در واحدهای تولیدی به منظور پایش تولید و کیفیت آن.

معاوضه و استفاده از سویه‌های میکروبی متعلق به کشورهای دیگر با شرایط اقلیمی مشابه برای بررسی کارایی و رسیدن به ترکیب مناسبی از سویه میکروبی و محصول.

آشنایی بیشتر جامعه کشاورزی کشور با محصولات زیستی و ترغیب آنها در بکارگیری کودهای زیستی در تولید محصولات کشاورزی.

استفاده از ظرفیت‌های ترویجی برای آشنایی بیشتر کشاورزان با کودهای زیستی و توسعه کاربرد آنها در تولید محصولات ارگانیک و سالم.

راه‌اندازی دوره ها و کارگاههای آموزشی برای تولیدکنندگان زراعی و باغی در جهت آشنایی با روش‌های کاربرد کودهای زیستی و مزیت‌های اقتصادی و زیست محیطی این نوع محصولات در مقایسه با کودهای شیمیایی.

منابع مورد استفاده

Agha Baba Dastjerdi M, Amini Dehaghi M, Bosaghzadeh Z, and Shafiee Adib S. 2017. Effect of biofertilizer on yield and quality characteristics of fennel in additive intercropping with perennial alfalfa. Plant Production Technology, 9(1): 125-140. (In Persian).

Alam S, Khalil S, Ayub N and Rashid M. 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. International Journal of Agriculture and Biology, 4: 454-458.

Alami-Milani M, Amini R and Bandehagh A. 2016. Effect of bio-fertilizers and combination with chemical fertilizers on grain yield and yield components of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 24(4): 15-29. (In Persian).

Aliasgharzad N, Rezaei Beyrami H. 2011. In vitro Propagation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Using Whole Plant. Agricultural Biotechnology, 2(1): 19-26. (In Persian).

Aliasgharzad N, Saleh Rastin N, Towfighi H and Alizadeh A. 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz Plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. Mycorrhiza, 11: 119-122.

Alijani M, Amini Dehaghi M, Malboobi MA, Zahedi M, Modares Sanavi SAM. 2011. The effect of different levels of phosphorus fertilizer together with phosphate bio-fertilizer (Barvar 2) on yield, essential oil amount and chamazulene percentage of *Matricaria recutita* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27(3): 450-459. (In Persian).

Amini R, Dabbagh Mohammadi Nasab A, Mahdavi S. 2017. Effect of organic fertilizers in combination with chemical fertilizer on tuber yield and some qualitative characteristics of potato (*Solanum tuberosum* L.). Journal of Agroecology, 9(3): 734-748.

Amini R, Gholami F, and Dabbagh Mohammadi Nasab A. 2018. Effect of magnetic water and organic fertilizers on growth characteristics of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.). Proceedings of International Agricultural Science Congress, Paper no. 210. Van Yuzuncu Yil University. May 09-12. Van, Turkey.

Amini R, Sakhavi Sh, Shakiba MR, and Dabbagh Mohammadi Nassab A. 2016. Effect of different intercropping patterns and fertilizers on some growth characteristics of faba bean (*Vicia faba* L.). International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 9(1): 9-15.

www.SID.ir

Archive of SID

Asadi Rahmani H, Khavazi K, Asgharzadeh A, Rejali F, Afshari M. 2013. Biofertilizers in Iran: Opportunities and challenges. Iranian Journal of Soil Research, 26(1): 77-87. (In Persian).

Azatykandeh H, Bolandnazar SA, Sarikhani MR. 2019. Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Arbuscular Mycorrhiza on Growth, Yield and Quality of Onion (*Allium cepa* L.) Horand Landrace. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 82(4): 41-58. (In Persian).

Basak BB and Biswas DR. 2009. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. Plant and Soil, 317(1-2): 235-255.

Besharati H, Aliasgharzad N, Khavazi K, AsadiRahmani H. 2017. A review on soil biology and biological properties of soils in Iran. Soil Biology, 4(2): 89-122. (In Persian).

Bhowmik SN, Das A. 2018. Biofertilizers: A Sustainable approach for pulse production. In: Legumes for Soil Health and Sustainable Management.(eds: RS Meena, A Das, GS Yadav, R Lal). pp 445-485. Springer.

Brahmaprakash GP and Sahu PK. 2012. Biofertilizers for Sustainability. Journal of the Indian Institute of Science, 92(1): 37-62.

Chamani F, Khodabandeh N, Habibi D, Asgharzadeh A and Davoudifard M. 2012. Effects of salinity stress on yield and yield components of inoculated wheat by plant growth promoting bacteria (*Azotobacter chroocccum*, *Azospirillum lipoferum*, and *Pseudomonase putida*) and humic acid. Journal of Agronomy and Plant Breeding, 8 (3): 1-13. (In Persian).

Dabbagh Mohammadi Nassab A, Amini R and Tamari E. 2015. Evaluation of maize and three cultivars of common bean intercropping with application of biofertilizers and chemical fertilizers. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 25: 99-113. (In Persian).

Darzi MT, Hadj Seyed Hadi MR and Rejali F. 2013. Effects of vermicompost and phosphatic biofertilizer application on quantity and quality of essential oil in anise (*Pimpinella anisum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29 (3): 583-594. (In Persian).

Ebrahimi M, Safari Sinegani AA, Sarikhani MR, Mohammadi SA. 2017. Comparison of artificial neural network and multivariate regression models for prediction of Azotobacteria population in soil under different land. Uses. Computers and Electronics in Agriculture, 140: 409–421.

Ebrahimi M, Safari Sinegani AA, Sarikhani MR, Aliasgharzad N. 2019. Assessment of Soluble and Biomass K in Culture Medium Is a Reliable Tool for Estimation of K Releasing Efficiency of Bacteria. Geomicrobiology Journal, 36(10): 873-880.

Ebrahimi1 M, Safari Sinegani AA, Sarikhani MR, Aliasgharzad. 2018. Study on phosphate solubilizing ability of some bacterial isolates and determination of solubilized phosphorus fractionation in supernatant and microbial biomass. Biological Journal of Microorganism, 7(25): 109-125. (In Persian).

Ebrahimi1 M, Safari Sinegani AA, Sarikhani MR, Mohammadi SA, Aliasgharzad N. 2018. Isolation, Identification, and Determination of Plant Growth Promoting Properties of Azotobacteria Isolated from Soil Samples North-West of Iran under Different Land Use. Applied Soil Research, 6(2): 27-42. (In Persian).

Eidizadeh Kh, Mahdavi Damghani AM, Ebrahimpoor Fand Sabahi H. 2012. Effects of integrated application of biological and chemical fertilizer and application method of biofertilizer on yield and yield components of maize. Journal of Crop Production, 4 (3): 21-35.

www.SID.ir

Archive of SID

Fageria NK. 2009. The use of nutrients in crop plants. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, USA, New York.

Faghih Abdollahi L, Pirdashti H, Yaghoubian Y and Alavi SM. 2015. Effect of *Piriformospora indica* and *Trichoderma tomentosum* fungi on basil (*Ocimum basilicum* L.) growth under copper nitrate levels. Journal of Soil Management and Sustainable Production, 5(1): 113-127. (In Persian).

FAO. 2019. Organic manures and biofertilizers. www.fao.org/tempref/docrep/fao/009/a0257e/a0257e05.pdf.

Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR and Staley JT. 2004. Bergey's Manualof Systematic Bacteriology, Springer-USA.

Glick BP. 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Scientifica. 1-15.

Goldstein AH. 2000. Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology, Proc, 4th Int, Fert, Assoc, Tech, Conf, IFA, Paris. p. 220.

Goswami D, Thakker JN and Dhandhukia PC. 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food and Agriculture, 2: 1-19.

Gravel V, Antoun H and Tweddell RJ. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomatoplants by inoculation with *Pseudomonas putida* or Trichodermaatroviride: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry, 39: 1968–1977.

Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ and Poole PS. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil, 245: 83-93.

Habibi A, Heidari GR, Sohrabi Y and Mohamadi Kh. 2013. Effect of biofertilizers and chemical fertilizers on yield and yield components of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28 (4): 604-615. (In Persian).

Hajinia S and Zarea MJ. 2015. Effect of co-inoculation of endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains on some physiological traits, nutrient absorption and grain yield of wheat (*Triticum aestivum* cv. Sardari) under salt stress conditions. Plant Production Technology, 14(2): 149-161. (In Persian).

Hamzei J and Sarmadi Naiebi H. 2011. Effect of biological and chemical fertilizers application on Yield, Yield Components, Agronomic Efficiency and Nitrogen Uptake in Corn. Plant Production Technology, 10(2): 53-63.

Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM .2008. Marschner review: global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soi, 311: 1–18.

Hojattipor E, Jafari Haghighi B, and Drostkar M. 2013. The effect of integration of biological and chemical fertilizers on yield, yield components and growth indexes of wheat. Journal of Plant Physiology, 5: 36-48. (In Persian).

Hong-bo Z, Xiao-xi Z, Fei-fei L, Guan-zhou Q and Yue-hua H. 2006. Screening, identification and desilication of a silicate bacterium. Journal of Central South University of Technology, 13(4): 337-341.

Jahanshahlo M, Dabbagh Mohammadi Nasab A, Shakiba MR, Amini R, Khagani-Nia S. 2012. Mineral and biological fertilizer effects on grain yield and yield components of borago (*Borago officinalis* L.) in sole- and intercropping with chickpea. Proceeding of International Conference of Plant Growth, Nutrition & Environment Interactions. P 89. February 18-21, Vienna, Austria.

www.SID.ir

Archive of SID

Jamshidi E, Ghalavand A, Sefidkon F and Goltaph EM. 2014. Positive Effect of fungi *Piriformospora indica* on fennel yield, yield components under effect of organic matter. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 23(4.1): 143-156. (In Persian).

Jashni R, Fateh E and Aynehband A. 2014. Evaluation of biological fertilizers and micronutrient elements effects on yield and some agronomic traits in rapeseed. Journal of Plant Production Research. 21(4): 205-210.

Javanmard A, Amani Machiani M, and Rasoli F. 2018. Improvement of forage quantity and quality in corn-legumes intercropping with nitroxin biofertilizer application in double cropping. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 28(1): 1-17. (In Persian).

Javanmard A, Mustafavi H, Khezri A, and Mohammadi S. 2016. Improvement of macro and micro nutrients accumulation in maize (*Zea mays* L.) grain by application of chemical and biological fertilizers. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 25(2.1): 27-43. (In Persian).

Jiménez DJ, Montaña JS and Martínez MM. 2011. Characterization of free nitrogen fixing bacteria genus *Azotobacter* in organicvegetable-growing Colombian soils, Brazilian Journal of Microbiology, 42: 846-858.

Karimzadeh-Asl Kh, Sefidkon F, Majnoon Hosseini N and Peighambari SA. 2014. The effect of different levels of soil moisture, zeolite and biofertilizers on physiological characteristics, yield and essential oil of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 30 (1): 158-173. (In Persian).

Kazemi Oskuei B, Bandehagh A, Sarikhani MR and Komatsu S. 2018. Protein Profles Underlying the Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Canola under Osmotic Stress. Journal of Plant Growth Regulation, 37: 560-574.

Keshavarz Zarjani J, Aliasgharzad N, Oustan S, Emadi M and Ahmadi A. 2013. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. Archive of Agronomy and Soil Science, 59(12): 1713-1723.

Khaki Najafabadi A, Jahan M, Koocheki A and Nassiri Mahalati M. 2017. Effects of intercropping of common millet (*Panicum miliaceum* L.) – cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and biological fertilizer inoculation on water and nitrogen use efficiencies. Iranian Journal of Field Crops Research, 15(3): 691-708. (In Persian).

Khalesro Sh, Ghalavand A, Sefidkon F and Asgharzadeh A. 2012. The effect of biological and organic inputs on quantity and quality of essential oil and some elements content of anise (*Pimpinella anisum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27 (4): 551-560. (In Persian).

Khan MS, Zaidi A and Wani PA. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review.Agronomy for Sustainable Development. 27: 29–43.

Khorramdel S, Koocheki A, Nassiri Mahallati M, and Ghorbani R. 2008. Application effects of biofertilizers on the growth indices of black cumin (*Nigella sativa* L.). Iranian Journal of Field Crops Research, 6(2): 285-295. (In Persian).

Khoshru B, Sarikhani MR, Aliasgharzad, Zare P. 2015. Assessment the important PGPR features of isolates used in biofertilizers Barvar2, Biosuperphosphate, Supernitroplus and Nitroxin. Applied Soil Research, 3(1): 39-52. (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Kim C, Mihály L, Kecskés Rosalind J, Deaker Gilchrist K, Peter B, Ivan R, Kennedy Kim S and Tongmin S. 2005. Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea. Canadian Journal of Microbiology, 51: 948–956.

Koide RT and Mosse B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. Mycorrhiza, 14: 145–163.

Leyser O. 2001. Auxinsignalling: the beginning, the middle and the end. Current Opinion in Plant Biology, 4: 382–386.

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.

Machuca A and Milagres AMF. 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. Letters in Applied Microbiology, 36: 177–181.

Mahdavi S, Dabbagh Mohammadi Nasab A, Amini R, Najafi N. 2015. Changes in morpho-physiological traits and gross income of potato (*Solanum tuberosum* L.) in response to different fertilizers. International Journal of Biosciences, 6(1): 109-116.

Malboobi MA, Zamani K, Lohrasebi T, Sarikhani MR, Samaian A and Sabet MS, 2014. Phosphate: the Silent Challenge. Progress in Biological Sciences, 4(1): 1-32.

Manninen M and Mattila-Sandholm T. 1994. Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores. Journal of Microbiological Methods, 19: 223-234.

Menbari S, Alizadeh Salte S, Bolandnazar SA, Sarikhani MR. 2018. Effect of Potabarvar and Sinorhizobium on Morphological Characteristics and Absorption of Some Nutrients in Fenugreek. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 28(2): 151-165. (In Persian).

Mohammadi Kh, Ghalavand A, Aghaalikhani M, Sohrabi Y and Heidari GhR. 2010. Impressibility of chickpea seed quality from different systems of increasing soil fertility. Journal of Crop Production, 3 (1): 103-119. (In Persian).

Mohtadi M, Mirhadi MJ, Charaty A and Bahadori M. 2015. Evaluating the effects bio-fertilizers containing non-symbiotic nitrogen-fixing and phosphate solubilizing bacteria on quantitative and qualitative traits of wheat. Journal of Soil Management and Sustainable Production, 5(1): 229-242. (In Persian).

Mojallali H and Weed SB, 1978. Weathering of micas by mycorrhizal soybean plants, Soil Science of American Journal, 42: 367-372.

Monjezi H, Moradi M, Orcid T, Siadat SA, Koochakzadeh A, and Hamdi H. 2014. Effect of application of sugarcane filter muds, chemical and biological fertilizers on canola grain yield and quality and some soil properties. Agricultural Crop Management, 16(2): 445-457. (In Persian).

Moradi S, Sarikhani MR, Aliasgharzad N. 2017. Assessment of potassium releasing ability of some bacterial isolates in in-vitro condition and identification of efficient isolates. Iranian Journal of Soil and Water Research, 48 (2): 385-395. (In Persian).

Moradi S, Sarikhani MR, Aliasgharzad N. 2017. The Effect of Some Bacterial Isolates on Root Growth and Nutrient Uptake in Corn (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 26: 33-47. (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

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

Mottaghian A, Pirdashti H, Bahmanyar MA and Motaghian B. 2013. Response of growth characteristics and nutrients uptake of basil (*Ocimum basiilicum* L.) to concomitant use of municipal waste compost and three species of *Trichoderma*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29 (2): 358-372. (In Persian).

Naghizade M, Ramroodi M, Galavi M, Siahsar B, Heydari M and Maghsoodi AA. 2012. The effects of various phosphorus fertilizers on yield and yield components of maize and grass pea intercropping. Iranian Journal of Field Crop Science, 43(2): 203-215. (In Persian).

Nayak T, Patangray AJ. 2015. Biofertilizer-beneficial for sustainable agriculture and improving soil fertility. Asian Journal of Multidisciplinary Studies, 3: 189-194.

Nobahar A, Sarikhani MR and Chalabianlou N. 2017. Buffering capacity affects phosphorous solubilization assays in rhizobacteria. Rhizosphere, 4: 119-125.

Paul EA. 2007. Soil Microbiology and Biochemistry, Third edithion, Linacre House, Jordan Hill, Oxford OX2 8DP, UK.

Pérez E, Sulbarán M, Ball MM and Yarzabál LA. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the southeastern Venezuelan region. Soil Biology and Biochemistry, 39: 2905-2914.

Raghothama KG and Karthikeyan AS. 2005. Phosphate acquisition. Plant and Soil, 274: 37–49.

Rahimzadeh S, Sohrabi Y, Heidari GhR, Eivazi AR and Hoseini T. 2011. Effect of bio and chemical fertilizers on yield and quality of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27 (1): 81-96. (In Persian).

Ramesh Kumar N, Thirumalai Arasu V and Gunasekaran P. 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. Current Science, 82(12):1463-1466.

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

Rostami H, Nakhzari Moghaddam A, Mollashahi M and Salahi Farahi M. 2017. Investigation of wheat cultivars response to combination of biologic and phosphorus fertilizers. Journal of Applied Research of Plant Physiology, 4(1): 187-206. (In Persian).

Roy RN, Finck A, Blair GJ, Tandon HLS. 2006. Plant nutrition for food security. FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Sachdev DP, Chaudhari HG, Kasture VM, Dhavale DD and Chopade BA. 2009. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumonia* strains from rhizosphere of wheat (*Triticumaestivum*) and their effect on plant growth. Indian Journal of Experimental Biology, 47: 993-1000.

Sadat A, Savaghebi Gh, Rejali F, Farahbakhsh M, Khavazi K and Shirmardi M. 2010. Effects of some Arbuscular Mycorrhizal Fungi and plant growth promoting rhizobacteria on the growth and yield indices of two wheat varieties in a saline soil. Journal of Water and Soil, 24(1): 53-62. (In Persian).

Saeidi M, Raei Y, Amini R, Taghizadeh A and Pasban-Eslam B. 2018. Changes in fatty acid and protein of safflower as response to biofertilizers and cropping system. Turkish Journal of Field Crops, 23(2): 117-126.

www.SID.ir

Archive of SID

Sahasrabudhe MM. 2011.Screening of rhizobia for indole acetic acid production, Annals of Biological Research, 2 (4): 460-468.

Sakhavi Sh, Amini R, Shakiba MR, Dabbagh Mohammadi Nasab A. 2017. Advantage of faba bean (*Vicia faba* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.) intercropping under organic, biological and chemical fertilizer treatments. Journal of Sustainable Agriculture and Production Science, 26(4): 17-32. (In Persian).

Sakhavi Sh, Amini R, Shakiba MR, Dabbagh Mohammadi Nasab A. 2018. Effect of bio- and chemical fertilizers on grain and essential oil yield of cumin (*Cuminum cyminum* L.) in intercropping with faba bean (*Vicia faba* L.). Journal of Sustainable Agriculture and Production Science, 27(2): 49-63. (In Persian).

Sakhavi Sh, Amini R, Shakiba MR, Dabbagh Mohammadi-Nasab A. 2017. Effect of Bio- and Chemical Fertilizers on Grain and Essential Oil Yield of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) in Intercropping with Faba Bean (Vicia faba L.). Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 27(2): 49-63. (In Persian).

Sarikhani MR, Ansari S. 2015**.** Assessment of Some Qualitative Characteristics of Common Biofertilizers in Iran. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production. 1-14. (In Persian).

Sarikhani MR, Ebrahimi M. 2011. Phosphate Biofertilizers (Phosphate solubilizing bacteria-Mycorrhizal fungi). The 1st Iranian Fertilizer Challenges congress: Half a century of the fertilizer consumption. 29 February-2 March, Tehran, Iran. (In Persian).

Sarikhani MR, Khoshru B and Oustan S. 2016. Efficiency of Some Bacterial Strains in Potassium Release from Mica and Phosphate Solubilization under In Vitro Conditions. Geomicrobiology Journal, 33(9): 832–838.

Sarikhani MR, Khoshru B, Greiner R. 2019. Isolation and identification of temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria as a potential microbial fertilizer. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35: 126.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Ebrahimi M. 2015. Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of Bacteria and Phosphate Solubilizing Genes, Mechanism and Genetics of Phosphate Solubilization. Agricultural Biotechnology Journal, 6(1): 76-110. (In Persian).

Sarikhani MR, Oustan Sh. Ebrahimi M, Aliasgharzad N. 2018. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. European Journal of Soil Science, 69: 1078–1086.

Sarikhani MR. 2015. Assessment of some conventional biofertilizers in Iran under laboratory and greenhouse conditions. University of Tabriz. (In Persian).

Sarikhani MR. 2015. Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers. Dasht Press. (In Persian).

Shamseldin A, Abdelkhalek A and Sadowsky MJ. 2017. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing,legume-associating bacteria: a review. Symbiosis, 71: 91–109.

Sharghi A, Bolandnazar SA, Naghdi Badi HA, Mehrafarin A, Sarikhani MR. 2018. Assessment of potassium releasing ability of some bacterial isolates in in-vitro condition and identification of efficient isolates. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 28(3): 55-66. (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Sharma AK and Glick BR. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck), Soil Biology and Biochemistry, 35: 887–894.

Sheikh Alipour P, Bolandnazar SA, Sarikhani MR, Irani F. 2017. Effect of some isolates of Pseudomonas inoculation on growth and nutrient uptake of tomato under field condition. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 26(1): 99-117. (In Persian).

Shin SH, Lim Y, Lee SE, Yang NW and Rhee JH. 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. Journal of Microbiological Methods, 44: 89–95.

Smith SE and Read D. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 3ed edition, Academic Press is an imprint of Elsevier.

Spaepen S and Vanderleyden J. 2010. Auxin and Plant-Microbe Interactions, Cold Spring HarbPerspect Biol, 1-13.

Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews, 24: 487-506.

Stevenson FJ. 2005. Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley and Sons, New York.

Tavakoli M and Jalali AH. 2016. Effect of different biofertilizers and nitrogen fertilizer levels on yield and yield components of wheat. Journal of Crop Production and Processing, 6: 33-45. (In Persian).

Usha DK and Kanimozhi K. 2011. Isolation and characterization of saline tolerant *Azospirillum* strains from paddy field of Thanjavur district. Advances in Applied Science Research, 2(3): 239-245.

Vafadar-Yengeje L, Amini R, Dabbagh Mohammadi Nasab A. 2019. Chemical compositions and yield of essential oil of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) in intercropping with faba bean (*Vicia faba* L.) under different fertilizers application. Journal of Cleaner Production, 239: 118033. In Press.

Vafadar-Yengeje L, Amini R, Dabbagh Mohammadi Nasab A. 2017. Growth characteristics and grain yield of faba bean (*Vicia faba* L.) as influenced by intercropping with Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica*) and fertilizers application. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 10(6): 186-192.

Vafadar-Yengeje L, Amini R, Dabbagh Mohammadi Nassab A. 2018a. Assessment of growth characteristics and yield of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica*) under Different Fertilizer Treatments in Intercropping with Faba Bean (*Vicia faba* L.). Journal of Sustainable Agriculture and Production Science, 28(2): 35-51. (In Persian).

Vafadar-Yengeje L, Amini R, Dabbagh Mohammadi Nassab A. 2018b. Yield and yield components of faba bean (*Vicia faba* L.) in intercropping with Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica*) under organic and chemical fertilizers. Journal of Sustainable Agriculture and Production Science, 27(4): 121-136. (In Persian).

Varma A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, Oelmueller R. 2012. *Piriformospora indica*: A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. Agricultural Research. 1(2): 117–131

www.SID.ir

Archive of SID

Zarinjoob H, Zarea MJ, Mohammadi Goltapeh E, Hatami A and Porsiabidi M. 2012. Effect of the various sources of phosphorus on yield and nutrient uptake of sunflower under two cropping system. Journal of Crop Production, 5 (3): 99-114. (In Persian).

Zhao Y. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. Annual Review of Plant Biology, 61:49–64.

Zorteaa RB, Maciel VG, Passuello A. 2018. Sustainability assessment of soybean production in Southern Brazil: A life cycle approach. Sustainable Production and Consumption, 13: 102-112.

www.SID.ir