توانایی باکتری‌های سودوموناس فلوروسنت در افزایش زیست فراهمی فسفر خاک و بررسی چند فرمولاسیون از جدایه‌های برتر

عبدالرضا اخگر[1]، مریم صادقی گوغری، پیمان عباس‌زاده دهجی و روح‌الله صابری ریسه

دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **arakhgar@yahoo.com**

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **maryam_sadeghi175@yahoo.com**

استادیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **p.abbaszadeh@vru.ac.ir**

دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **r.saberi@vru.ac.ir**

دریافت: **99/2/13** و پذیرش: **1400/3/19**

چکیده

فسفر یکی از عناصر مورد نیاز گیاه است و کاهش تثبیت یا افزایش فراهمی آن در خاک می‌تواند نقش مؤثری در کاهش مصرف کودهای شیمیایی داشته باشد. این پژوهش به‌منظور بررسی چند فرمولاسیون از باکتری سودوموناس فلورسنت حل‌کننده فسفات انجام گرفت. بدین منظور ابتدا 30 جدایه از باکتری‌های گروه سودوموناس فلورسنت از بانک میکروبی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان تهیه گردید. سپس توانایی جدایه‌ها برای حل تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع اندازه‌گیری شد. همچنین در زمان‌های 15، 30 و 60 روز، توانایی جدایه‌ها در افزایش زیست فراهمی فسفر در خاک (با و بدون حضور خاک فسفات) تعیین گردید. در آخر ماندگاری جدایه‌های منتخب در چند فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمامی جدایه‌ها قادر به افزایش حلالیت تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع PKV و کاهش pH محیط کشت بودند. بیشترین و کمترین حلالیت تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد PKV به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های D33 و D24 و در محیط مایع به‌ترتیب مربوط به D6 و D4 بود. همچنین نتایج نشان داد که جدایه D33 فراهمی فسفر خاک را در زمان‌های 15، 30 و 60 روز به‌ترتیب معادل 48، 25 و 75 درصد و جدایه D33 به‌ترتیب معادل 72، 50 و 26 درصد نسبت به شاهد افزایش دادند. بررسی جمعیت جدایه‌های D33 و D35 در سه فرمولاسیون پودر تالک، پودر تالک+سبوس برنج و پودر تالک+خاک اره در 150 روز پس از تهیه نشان داد که بیشترین و کمترین جمعیت جدایه D33 به‌ترتیب مربوط به فرمولاسیون پودر تالک و پودر تالک+سبوس برنج (10^5 cfu/g) و فرمولاسیون پودر تالک+خاک اره (8×10^3 cfu/g) بود. همچنین بیشترین و کمترین جمعیت جدایه D35 به ترتیب در فرمولاسیون پودر تالک+سبوس برنج (10^5 cfu/g) و پودر تالک+خاک اره (10cfu/g) مشاهده گردید. در مجموع فرمولاسیون پودر تالک+سبوس برنج توانست در پایان 150 روز جمعیت جدایه‌های D33 و D35 را در حد قابل قبول و معادل 10^6cfu/g نگه‌دارد.

واژه‌های کلیدی: باکتری ریزوسفری محرک رشد گیاه، فرمولاسیون، مایه تلقیح

---

[1] نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

مقدمه

امروزه مشکلات اقتصادی ناشی از افزایش رو به رشد هزینه کودهای شیمیایی از یک سو و مسائل زیست محیطی مرتبط با مصرف غیر اصولی این کودها از سوی دیگر، تفکر استفاده از شیوه‌های زیستی برای تقویت رشد و افزایش عملکرد محصولات زراعی را قوت بخشیده است (کوموتا و همکاران، 2004). فسفر یکی از عناصر اصلی و ضروری مورد نیاز برای رشد و توسعه محصولات کشاورزی است (شارما و همکاران، 2013). اکثر خاک‌های کشاورزی شامل ذخایر بزرگی از فسفر به شکل معدنی هستند، اما غلظت فسفر قابل دسترس برای گیاهان بسیار پایین می‌باشد (ریچاردسون و همکاران، 2009). به دلیل این‌که یون‌های فسفات بسیار واکنش‌پذیر بوده و به شکل کمپلکس‌های فلزی با کلسیم در خاک‌های آهکی و آهن و آلومینیوم درخاک‌های اسیدی تثبیت می‌شوند (نوریش و رز، 1983) لذا بهره‌بردای از فسفر پایین بوده و برای جبران سالانه از منابع معدنی گران قیمت یعنی کودهای فسفره به مقدار زیاد استفاده می‌شود (هاروی و همکاران، 2009) که این امر اقتصادی نبوده و باعث تخریب محیط زیست می‌گردد (گیانشوار و همکاران، 2002). از این رو تلاش‌هایی در جهت جایگزینی ابزارهای بیوتکنولوژی و دوست‌دار محیط زیست در فعالیت‌های کشاورزی پایدار مثل استفاده از کودهایی که پایه میکروبی دارند صورت گرفته است (دوبلر و همکاران، 2003).

تحقیقات انجام شده روی برهم‌کنش بین گیاهان، خاک و سایر ریزجانداران نشان داده است که روابط بین آن‌ها می‌تواند راه‌هایی را برای استفاده از این موجودات در اهداف کشاورزی امکان‌پذیر سازد (مالوسا و همکاران، 2012). از منابع زیستی می‌توان به باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، که به آن‌ها باکتری‌های PGPR[1] اطلاق می‌گردد، اشاره کرد. در بین باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB[2]) می‌تواند یک روش جایگزین برای برآوردن نیاز گیاهان به فسفر در کشاورزی پایدار باشد (لاواکوشا و همکاران، 2014). مشخص شده است که تعداد زیادی از ریزجانداران از جمله باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول را دارند (باشان و همکاران، 2013؛ سلوی و همکاران، 2017). گزارش‌های متعددی وجود دارد که توانایی سویه‌های مختلف باکتریایی در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول همچون تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، دی هیدروکسی آپاتیت و خاک فسفات را نشان می‌دهد (خوشرو و همکاران، 2015؛ ملبوبی و همکاران، 2009؛ ساریخانی و همکاران، 2016). باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توانند ترکیبات فسفات نامحلول را از طریق فرایندهای تولید پروتون، تولید اسیدهای آلی با وزن ملکولی کم مانند سیتریک اسید، گلوکونیک اسید و نیز تولید عوامل کلات‌کننده به اشکال قابل استفاده برای گیاهان تبدیل کنند (لیو و همکاران، 2014). باکتری‌های حل‌کننده فسفات علاوه بر توانایی انحلال فسفر نامحلول، از طریق مکانیسم‌های دیگری چون تولید هورمون‌های گیاهی، سیدروفور و کنترل ریزجانداران بیماری‌زا تأثیرات مفید دیگری نیز بر روی رشد گیاه دارند (وسی، 2003).

کودهای میکروبی نوعی از کودهای زیستی هستند که از ریزجانداران مفید در بستری از مواد آلی- معدنی بهره برده می‌شود. یکی از کودهای میکروبی مهم، کود میکروبی فسفاتی است که با توجه به اهمیت فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای محصولات کشاورزی، استفاده از آن مورد توجه قرار گرفته است (ضیائیان و همکاران، 1388). کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات‌های معدنی در خاک به عنوان کود میکروبی، یکی از راه‌های مؤثر برای افزایش قابلیت جذب فسفر در خاک است. این دسته از باکتری‌ها گرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند، ولی بخشی از آن

1. Plant Growth Promoting Rhizobacteria; (PGPR)

2. Phosphate Solubilizing Bacteria; (PSB)

که در محیط آزاد شده است می‌تواند در اختیار گیاه قرار گیرد (فاجریا، 2009).

اگر چه فرمولاسیون مایع از نظر استفاده آسان و آبگیری مجدد بر فرمولاسیون پودری ارجحیت دارد (ملین و همکاران، 2006). ولی قابلیت ماندگاری آن در طول دوره نگه‌داری در مقایسه با فرمولاسیون پودری بسیار پایین می باشد (ملین و همکاران، 2007). از این رو معمولاً در شرایط مزرعه از مایه تلقیح باکتری‌های محرک رشد به عنوان کود میکروبی به‌صورت مایع (سوسپانسیون باکتریایی) استفاده نمی‌شود بلکه برای سهولت حمل و نقل و ذخیره‌سازی، سوسپانسیون باکتریایی را با حامل جامد معینی مخلوط و به صورت فرمولاسیون مناسب مورد استفاده قرار می‌دهند (کلوپر، 1993). یک محصول میکروبی فرموله شده به معنای محصولی متشکل از توده زیستی به همراه موادی است که رشد و عملکرد محصول را بهبود بخشد (شیسلر و همکاران، 2004).

مختارنژاد و همکاران (1390) در تهیه کود میکروبی برای سلول‌های مخمر از فرمولاسیون‌های پودری تالک، کائولین، سبوس گندم و سبوس برنج همراه با افزودنی‌های مختلف شامل سوکروز، صمغ عربی و سدیم آلژینات استفاده نمودند. در این تحقیق آنها ماندگاری فرمولاسیون‌های نگه‌داری شده در شرایط تاریکی و در دمای 4 و 24 درجه سلسیوس را در مدت شش ماه اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد بیشترین جمعیت سلول در دمای 4^{oc} در فرمولاسیون‌های سبوس گندم همراه با صمغ عربی و سبوس گندم همراه با سوکروز رخ داد و در 24^{oc} حداکثر ماندگاری عامل زیستی مربوط به سبوس برنج همراه با سوکروز بود.

در تحقیقی دیگر به منظور تهیه کود میکروبی فسفاته پودری از فرمولاسیونی شامل مخلوطی از سنگ فسفات، باگاس و گوگرد به نسبت 45 : 30 : 15 استفاده گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات در این فرمولاسیون با زمان روندی کاهشی داشت؛ به طوری که پس از گذشت شش ماه از تلقیح، میانگین جمعیت جدایه‌های مورد آزمون از $3/5\times10^6$ به $7/3\times10^4$ سلول باکتری در گرم فرمولاسیون (cfu/g) رسید (خوشرو و ساریخانی، 1397).

رمز موفقیت یک کود میکروبی علاوه بر انتخاب بهترین سویه، فرمولاسیون مناسب با ماندگاری قابل قبول آن است و برای دستیابی به این ماندگاری مناسب، لازم است فرمولاسیون‌های متعددی مورد آزمون قرار گرفته تا مناسب‌ترین فرمولاسیون که بتواند در شرایط خاک عامل میکروبی را تا ظهور ریشه‌ها و تلقیح آنها زنده نگه‌دارد انتخاب نمود. از این رو و با توجه به ضرورت استفاده از کودهای میکروبی به صورت یک فرمولاسیون مناسب در کشاورزی، این پژوهش به هدف بررسی چند فرمولاسیون از حیث ماندگاری باکتری‌های سودوموناس فلورسنت حل‌کننده فسفات‌های معدنی و انتخاب فرمولاسیون مناسب انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

در این تحقیق تعداد 30 جدایه PGPR از گروه سودوموناس‌های فلورسنت از بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصررفسنجان تهیه گردید.

بررسی توان جدایه‌ها در حل تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد

ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط مایع King B کشت داده شدند. پس از تنظیم تراکم سوسپانسیون‌ها برابر یک در طول موج 600 نانومتر، 10 میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با روش لکه‌گذاری در سه تکرار روی پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد PKV[1] (در هر لیتر شامل 10 گرم گلوکز، 0/5 گرم $(NH_4)_2SO_4$، 0/5 گرم $MgSO_4.7H_2O$، 0/3 گرم NaCl، 0/03 گرم $FeSO_4.7H_2O$، 0/02 گرم $MnSO_4.H_2O$، 0/3 گرم KCl و 5 گرم $Ca_3(PO_4)_2$) تلقیح و پلیت‌ها در دمای

[1] Pikovskaya

28 درجه سلسیوس به مدت پنج روز در انکوباتور نگه‌داری شدند. هاله شفاف اطراف کلنی به عنوان معیاری از میزان حلالیت تری‌کلسیم فسفات در نظر گرفته شد. در این آزمون توانایی جدایه‌ها در انحلال تری‌کلسیم فسفات از طریق محاسبه نسبت قطر هاله بر قطر کلنی تعیین گردید (رشید و همکاران، 2004).

بررسی توان جدایه‌ها در حل تری‌کلسیم فسفات در محیط مایع

برای این منظور از محیط مایع PKV حاوی دو و نیم گرم بر لیتر نمک نامحلول تری‌کلسیم فسفات استفاده شد. ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط مایع King B کشت داده شدند و پس از تنظیم تراکم سوسپانسیون‌ها برابر یک در طول موج 600 نانومتر، 100 میکرولیتر از تعلیق هر باکتری به 30 میلی‌لیتر محیط PKV منتقل گردید. ارلن‌های تلقیح شده همراه با یک شاهد (محیط کشت بدون باکتری) به مدت 120 ساعت تکان داده شدند. آنگاه pH سوسپانسیون‌های باکتریایی قرائت شد. بخشی از سوسپانسیون باکتری‌ها نیز سانتریفوژ (با دور 10000 به مدت 15 دقیقه) شدند. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات - وانادات مخلوط و پس از 20 دقیقه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 470 نانومتر قرائت گردید. غلظت فسفر بر حسب میلی‌گرم بر لیتر با مقایسه جذب نوری هر سوسپانسیون با منحنی استاندارد تهیه شده با KH_2PO_4 محاسبه شد (جئوان و همکاران، 2003).

تهیه خاک

به منظور بررسی توانایی جدایه‌های منتخب در افزایش زیست فراهمی فسفر در شرایط آزمایشگاهی از یک خاک زراعی با بافت شنی لومی غیر شور با فسفر قابل دسترس کم استفاده شد. برای این خاک برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن شامل بافت به روش هیدرومتر (بایکاس، 1951)، pH گل اشباع به وسیله دستگاه pH متر، هدایت الکتریکی عصاره اشباع با دستگاه هدایت سنج الکتریکی و مقدار فسفر قابل دسترس به روش اولسن (اولسن، 1954) با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80UV/VIS Spectrometer) تعیین گردید. همچنین سنگ فسفات مورد استفاده در این آزمون از نوع رسوبی بوده و از معدن پارسا واقع در استان فارس تهیه گردید.

بررسی تأثیر باکتری‌ها بر افزایش زیست فراهمی فسفر در خاک در شرایط آزمایشگاهی

هدف از انجام این آزمون ارزیابی توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی خاک در حضور و عدم حضور سنگ فسفات و انتخاب جدایه‌های برتر برای تهیه فرمولاسیون مناسب بود. با توجه به نتایج آزمون‌های تعیین توان جدایه‌ها در حل تری‌کلسیم فسفات در محیط‌های جامد و مایع، تعداد 10 جدایه سودوموناس فلورسنت انتخاب شدند. جدایه‌ها به مدت 48 ساعت درون محیط کشت TSB[1] (با نصف غلظت متعارف) در دمای 28 درجه سلسیوس درون شیکر انکوباتور کشت داده شدند و پس از هم‌سان نمودن تراکم سوسپانسیون‌ها به عنوان مایه‌تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند.

این آزمون در شرایط آزمایشگاه، درون ظروف حاوی 40 گرم خاک به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجراشد. فاکتورها شامل تلقیح باکتری در 12 سطح (10 جدایه سودوموناس فلورسنت، تیمار بدون باکتری با مقادیر کافی کود فسفره از منبع K_2HPO_4به‌عنوان شاهد مثبت و تیمار بدون باکتری و کود فسفره به‌عنوان شاهد منفی) و نوع خاک در دو سطح (ظروف حاوی 40 گرم خاک استریل و ظروف حاوی 40 گرم خاک استریل همراه با 0/03 گرم سنگ فسفات پودر شده) بودند. لازم به ذکر است درتیمارهای باکتریایی، هر خاک با چهار میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری مربوطه با تراکم 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر تلقیح گردید. برای تیمار شاهد مثبت از چهار میلی‌لیتر محیط کشت بدون باکتری و غنی شده با 0/1 مولار K_2HPO_4 و برای شاهد منفی صرفاً

1. Tryptic Soy Broth

از چهار میلی‌لیتر محیط کشت بدون باکتری استفاده گردید. این آزمون برای سه زمان مختلف 15، 30 و 60 روز به‌طور جداگانه انجام و فسفر قابل دسترس خاک با دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل T80UV/VIS Spectrometer) و به روش اولسن اندازه‌گیری شد. در ضمن هوادهی ظروف هر پنج روز یک‌بار انجام و رطوبت نمونه‌های خاک نیز هر پنج روز بک بار با آب مقطر استریل در 70% ظرفیت زراعی تنظیم گردید.

تهیه فرمولاسیون باکتریایی

در این پژوهش از فرمولاسیون‌های زیر استفاد شد:

1- پودر تالک 64 گرم + CMC[1] 16 گرم + دو میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی واجد 10^9 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر + هشت میلی‌لیتر آب مقطر استریل.

2- پودر تالک 21/3 گرم + سبوس برنج 21/3 گرم + پودر سویا 21/3 گرم + CMC 16 گرم + دو میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی واجد 10^9 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر + هشت میلی‌لیتر آب مقطر استریل.

3- پودر تالک 21/3 گرم + خاک اره 21/3 گرم + پودر سویا 21/3 گرم + CMC 16 گرم + دو میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی واجد 10^9 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر + هشت میلی‌لیتر آب مقطر استریل.

ابتدا برای هر فرمولاسیون، مقادیر ذکر شده به صورت پودری با هم مخلوط گردید. سپس از سوسپانسیون دو باکتریایی منتخب به فرمولاسیون‌ها اضافه و به مدت هشت ساعت زیر هود و در دمای اتاق قرار داده شد تا آب اضافی تبخیر شود. لازم به ذکر است که نسبت CMC به بقیه مواد یک به چهار (1:4) بود (ناکران و همکاران، 2005). در ضمن برای بررسی ماندگاری باکتری در فرمولاسیون‌ها، مقداری از ترکیب حاصل در دمای اتاق درون لوله‌های فالکون نگه‌داری شد تا هر 30 روز یک بار و برای مدت 150 روز جمعیت آنها بررسی گردید.

تعیین ماندگاری باکتری‌ها در فرمولاسیون‌ها

برای بررسی ماندگاری باکتری در فرمولاسیون‌های مورد آزمون جمعیت باکتری برای مدت 150 روز و در فواصل زمانی 30 روزه اندازه‌گیری شد. بدین منظور یک گرم از هر فرمولاسیون باکتری به 99 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه و به مدت نیم ساعت با 200 دور بر دقیقه تکان داده شد. سپس از سوسپانسیون حاصل سری رقت تهیه گردید (10^{-1} تا 10^{-9}). از هر رقت به مقدار 100 میکرولیتر روی محیط کشت جامد TSB (با نصف غلظت متعارف) درون پتری دیش‌ها در سه تکرار پخش و پتری دیش‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس درون اینکوباتور قرار داده شدند تا کلنی‌ها ظاهر گردند. جمعیت باکتری در هر گرم فرمولاسیون با شمارش کلنی‌های ظاهر شده در رقت مناسب (50 تا 150 کلنی در پلیت) و معدل‌گیری از تکرارها محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SASصورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. همچنین جدول‌ها و نمودارهای مربوطه با استفاده از برنامه‌های Word و Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

توانایی جدایه‌های سودوموناس فلوروسنت در حل تری-کلسیم فسفات

نتایج آزمون توانایی جدایه‌ها در انحلال تری-کلسیم فسفات نشان داد که تمامی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت قادر به افزایش حلالیت تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع PKV و کاهش pH محیط کشت بودند. بیش‌ترین و کم‌ترین توانایی انحلال تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های D26 (با نسبت قطر هاله به کلونی معادل 2/60) و D24 (با نسبت قطر هاله به کلونی معادل 1/12) و در محیط مایع به‌ترتیب مربوط به جدایه D6 (706 میلی‌گرم در لیتر) و D4 (203 میلی‌گرم در لیتر) بود. همچنین بیشترین

[1] arboxymethyl cellulose

کاهش pH محیط کشت در نتیجه رشد جدایه D11 بدست آمد (جدول 1). در بین جدایه‌های مورد آزمایش، جدایه‌های D1، D5، D6، D11، D12، D19، D26، D28، D33 و D35 که در مجموع از توانایی بالایی در انحلال تری‌کلسیم فسفات برخوردار بودند برای استفاده در مراحل بعدی پژوهش انتخاب شدند. باکتری‌های حل کننده فسفات با تولید اسیدهای آلی و عوامل کلات کننده می‌توانند موجب افزایش حلالیت فسفات‌های معدنی کم‌محلول در خاک شوند (همیدا و همکاران، 2006). در تحقیقی نشان داده شد که جدایه‌هایی از باکتری‌های حل کننده فسفات شامل *Bacillus* sp. و *Pseudomonas* sp. جداشده از خاک ریزوسفری ، حلالیت فسفر را در محیط مایع PKV حاوی تری‌کلسیم فسفات به‌ترتیب به‌مقدار 12/23 و 9/72 میلی‌گرم در لیتر افزایش داده، pH محیط را از 7 به 3/78 و 5/1 کاهش دادند(سوسیلواتی و سیخفانی، 2014).

جدول 1- نتایج اندازه‌گیری توان حل تری‌کلسیم فسفات توسط جدایه‌های مورد آزمایش در محیط مایع و جامد PKV و pH محیط کشت جدایه‌ها

شماره جدایه	نسبت قطر هاله به کلونی	غلظت فسفر آزاد شده (میلی‌گرم در لیتر)	pH
D1	1/73	654	3/86
D4	1/63	203	5/63
D5	2/09	530	5/82
D6	1/66	706	5/71
D7	1/37	537	5/91
D8	2/11	499	5/94
D9	1/38	487	4/50
D10	1/59	415	5/61
D11	2/10	596	3/62
D12	1/27	664	3/84
D14	1/77	465	5/12
D15	1/35	412	4/97
D16	1/95	213	5/64
D18	1/81	520	3/98
D19	1/18	650	3/87
D20	1/71	410	5/74
D21	2/10	449	5/42
D22	1/56	352	4/12
D23	1/74	282	5/72
D24	1/12	423	5/31
D25	2/31	447	5/91
D26	2/60	526	3/97
D27	1/15	382	5/71
D28	2/91	559	3/95
D29	1/57	565	3/52
D31	1/76	391	77/3
D32	1/44	567	4/31
D33	2/61	561	5/75
D34	1/97	380	5/64
D35	2/35	465	3/86

بررسی تأثیر باکتری‌ها بر زیست فراهمی فسفر در خاک در شرایط آزمایشگاهی

برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمون بررسی توانایی جدایه‌های منتخب در افـزایـش زیـست فراهمی فسفر در شرایط آزمایشگاهی و همچنین ترکیب شیمیایی سنگ فسفات که در آزمایشگاه گروه مهندسی معدن دانشکده فنی دانشگاه تهران اندازه‌گیری شده است به ترتیب در جداول 2 و 3 ارائه شده است.

جدول 2- برخی از خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک مورد مطالعه

ویژگی	مقدار
رس (درصد)	9/0
سیلت (درصد)	10/8
شن (درصد)	80/2
بافت	شنی لومی
pH	8/03
قابلیت هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر)	1/2
فسفر قابل دسترس به روش اولسن (میلی‌گرم در کیلوگرم)	4/44

جدول 3- ترکیب شیمیایی سنگ فسفات پارسا (کیانی ارثی و همکاران، 2010).

اکسید	SiO_2	Al_2O_3	Na_2O	K_2O	CaO	MgO	P_2O_5	Fe_2O_3	MnO	ZnO
درصد	15/7	1/41	0/09	0/50	43/10	1/04	15/39	2/49	0/01	0/04

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد باکتری و برهمکنش بین باکتری و نوع خاک، تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر انحلال فسفات‌های معدنی در 15، 30 و 60 روز پس از تلقیح خاک بوسیله جدایه‌ها داشت؛ لیکن نوع خاک (حضور یا عدم حضور سنگ فسفات) در دوره‌های زمانی مذکور هیچ تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول 4).

جدول 4- تجزیه واریانس اثر باکتری و نوع خاک بر غلظت فسفر قابل دسترس به روش اولسن

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		15روز پس از تلقیح	30 روز پس از تلقیح	60 روز پس از تلقیح
باکتری	11	$42/7^{**}$	114^{**}	$49/2^{**}$
نوع خاک	1	$27/4^{ns}$	$71/3^{ns}$	$7/18^{ns}$
باکتری × نوع خاک	11	$85/5^{**}$	$83/6^{**}$	$36/6^{**}$
خطا	48	4/75	4/72	2/03
ضریب تغییرات		11/9	10/9	9/00

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک و پنج درصد و غیرمعنی‌دار بودن را نشان می‌دهند.

تأثیر باکتری و نوع خاک بر فسفر قابل دسترس خاک در 15 روز پس از تلقیح

بیشترین مقدار فسفر قابل استفاده در تیمار خاک و تحت تأثیر کنترل مثبت (تیمار واجد کود فسفر) به‌دست آمد. در بین باکتری‌ها سویه‌های D33 و D35 به‌ترتیب با فراهم ساختن 21/0 و 20/5 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر قـابل استفاده بهترین تیمار بودند که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. به‌طور کلی نتایج نشان داد که هر چند جدایه‌ها نتوانستند مقدار فسفر قابل استفاده را در حد کنترل مثبت افزایش دهند، اما تعدادی از سویه‌ها مقدار فسفر قابل استفاده در تیمار خاک و همچنین تیمار خاک + سنگ فسفات را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد منفی افزایش دادند (جدول 5)

جدول 5- مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای نوع خاک و باکتری برمقدار فسفر قابل دسترس خاک، 15 روز پس از تلقیح جدایه‌ها به خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)

جدایه	خاک	خاک + سنگ فسفات	میانگین
Control$^-$	15/1g-h	15/5g-h	15/1E
D1	15/1g-h	21/6c-e	18/3CD
D5	13/3ih	16/6f-h	15/6DE
D6	14/7g-h	20/9c-e	17/1DE
D11	15/8d-g	16/7f-h	17/6DE
D12	20/0c-f	16/4g-h	17/3DE
D19	17/5e-h	18/3e-g	17/9DE
D26	18/5d-g	13/1i	15/8DE
D28	12/9i	23/2cb	18/1CD
D33	22/4b-d	19/6c-f	21/0B
D35	25/8b	15/3g-h	20/5BC
Control$^+$	32/5a	16/6f-h	24/6A
میانگین	18/9A	17/6A	

میانگین‌های اثرات اصلی دارای حداقل یک حروف لاتین بزرگ مشترک و میانگین‌های اثرات متقابل دارای حداقل یک حروف لاتین کوچک مشـترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

Control$^+$ و Control$^-$ به ترتیب تیمار بدون باکتری با مقادیر کافی کود فسفره (شاهد مثبت) و تیمار بدون باکتری و کود فسفره (شاهد منفی)

تأثیر باکتری و نوع خاک بر فسفر قابل دسترس خاک در 30 روز پس از تلقیح

نتایج نشان داد که در تیمار خاک، کاربرد جدایه‌های D1، D5، D19 و D35 بـاعث افزایش معنی‌دار فسفر قابل دسترس در مقایسه با کنترل منفی شدند. سویه‌های D6، D11 و D28 در تیمار خاک + سنگ فسفات موثرترین سویه‌ها در افزایش فسفر قابل استفاده بودند (جدول 6).

جدول 6- مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای خاک و باکتری بر فسفر قابل دسترس خاک، 30 روز پس از تلقیح جدایه‌ها به خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)

جدایه	خاک	خاک + سنگ فسفات	میانگین
Control$^-$	15/4i-m	16/8h-l	16/1D
D1	20/9d-h	20/3d-h	20/6B
D5	22/5c-f	13/9k-m	18/2BC
D6	14/8j-m	24/3b-d	19/5BC
D11	12/5m	22/7c-e	17/6B-D
D12	16/0i-m	18/6f-j	17/3CD
D19	23/9b-d	14/9j-m	19/4BC
D26	19/1e-g	18/1g-k	18/6BC
D28	13/8lm	25/9bc	19/4BC
D33	19/2e-g	17/4h-l	18/3BC
D35	22/1c-g	17/7h-l	19/9BC
Control$^+$	27/4b	39/0a	33/2A
میانگین	18/9B	20/9A	

میانگین‌های اثرات اصلی دارای حداقل یک حروف لاتین بزرگ مشترک و میانگین‌های اثرات متقابل دارای حداقل یک حروف لاتین کوچک مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

Control$^+$ و Control$^-$ به ترتیب تیمار بدون باکتری با مقادیر کافی کود فسفره (شاهد مثبت) و تیمار بدون باکتری و کود فسفره (شاهد منفی)

تأثیر باکتری و نوع خاک بر فسفر قابل دسترس خاک در 60 روز پس از تلقیح

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین مقدار فسفر در60 روز پس از تلقیح جدایه‌ها به خاک، از برهمکنش شاهد مثبت و تیمار خاک + سنگ فسفات بدست آمد و کمترین مقدار آن نیز در تیمار خاک و تحت تأثیر جدایه باکتری D6 ایجاد شد. در تیمار خاک، جدایه D1 با فراهم ساختن 23/6 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر بیشترین تأثیر را داشت. در تیمار خاک + سنگ فسفات سویه‌های D6، D12 و D26 هر سه با فراهم نمودن 17/0 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر قابل دسترس، کارامدترین جدایه‌ها بوده و اختلاف معنی‌داری با شاهد منفی با میانگین 14/1 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر داشتند (جدول 7).

باکتری‌های حل‌کننده فسفات قادرند شرایط را برای افزایش راندمان استفاده از کود فراهم کنند. سازوکار اصلی اینگونه ریزجانداران تولید اسیدهای آلی توسط اکسایش ناقص قندها است که باعث کاهش pH و افزایش حلالیت فسفر محیط می‌شوند (کوموتا و همکاران، 2004). همچنین این باکتری‌ها سبب کاهش تثبیت فسفر در خاک می‌شوند و تلقیح با باکتری‌های حل‌کننده فسفات، فسفر قابل جذب خاک را افزایش می‌دهد (گوپتا و همکاران، 2012). فرناندز و همکاران (2007) اثر مثبت باکتری‌های حل‌کننده فسفر را در حضور سنگ فسفات بر سویا نشان دادند. آنتون (2002) نیز در تحقیقی گزارش نمود باکتری‌های حل‌کننده فسفات با تولید اسید قابلیت حل فسفر را از منابع غیر قابل انحلال نظیر سنگ فسفات افزایش دادند. دوبی و بیلور (1992) نشان دادند اضافه کردن سنگ فسفات به همراه باکتری‌های حل‌کننده فسفات با افزایش فراهمی فسفر در خاک باعث افزایش عملکرد ذرت شد.

جدول 7- مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای خاک و باکتری بر فسفر قابل دسترس خاک، 60 روز پس از تلقیح جدایه‌ها به خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)

جدایه	خاک	خاک+ سنگ فسفات	میانگین
Control$^-$	12/1i	14/1f-h	13/1G
D1	23/6b	15/2e-h	19/4B
D5	13/8f-i	14/9e-h	14/4D-G
D6	9/63j	17/0de	13/3FG
D11	15/0e-h	15/5ef	15/3C-E
D12	14/6e-i	17/0de	15/8CD
D19	15/4e-g	14/7e-i	15/0E-G
D26	12/4hi	17/0De	14/76E-H
D28	13/8f-i	15/5ef	14/6D-G
D33	21/2c	12/8f-h	17/0C
D35	15/2e-h	12/6g-i	13/9E-G
Control$^+$	19/3cd	26/7a	23/0A
میانگین	15/5A	16/1A	

میانگین‌های اثرات اصلی دارای حداقل یک حروف لاتین بزرگ مشترک و میانگین‌های اثرات متقابل دارای حداقل یک حروف لاتین کوچک مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

Control$^+$ و Control$^-$ به ترتیب تیمار بدون باکتری با مقادیر کافی کود فسفره (شاهد مثبت) و تیمار بدون باکتری و کود فسفره (شاهد منفی)

لازم به ذکر است در آزمون‌های ارزیابی توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی خاک در سه زمان 15، 30 و 60 روز پس از تلقیح جدایه‌ها، مقدار فسفر قابل دسترس خاک در تیمار شاهد منفی نسبت به فسفر اندازه‌گیری شده به روش اولسن در خاک خشک (4/4 میلی‌گرم در کیلوگرم) بیشتر بود. از آنجایی که در هنگام تلقیح تیمارها، به تیمار شاهد منفی چهار میلی‌لیتر محیط کشت بدون باکتری افزوده شد و آزمون نیز در شرایط غیر استریل انجام گرفت؛ لذا افزایش مقدار فسفر قابل دسترس در تیمار شاهد منفی را می‌توان به افزایش فعالیت باکتری‌های بومی خاک ناشی از افزودن محیط کشت نسبت داد.

بررسی ماندگاری باکتری‌های فرموله شده در حامل‌های مختلف

با در نظر گرفتن نتایج حاصل از توانایی جدایه‌ها در افزایش فسفر قابل دسترس خاک به روش اولسن، دو جدایه سودوموناس فلورسنت D33 و D35 انتخاب و برای بررسی ماندگاری آنها در سه فرمولاسیون پودر تالک، پودر تالک + سبوس برنج و پودر تالک + خاک اره مورد استفاده قرارگرفتند. شکل‌های 1 و 2 ماندگاری جدایه‌های D33 و D35 را در مدت زمان نگه‌داری (150روز در دمای اتاق) برای سه فرمولاسیون پودر تالک، پودر تالک + سبوس برنج و پودر تالک + خاک اره نشان می‌دهند. همانطور که ملاحظه می‌شود جمعیت این باکتری‌ها در این فرمولاسیون‌ها روندی کاهشی داشت و بیشترین شدت افت جمعیت باکتری در این فرمولاسیون‌ها نیز پس از گذشت 30 روز از تهیه فرمولاسیون‌ها رخ داد. بیشترین و کمترین جمعیت جدایه D33 پس از گذشت 150 روز از تلقیح، به ترتیب مربوط به فرمولاسیون پودر تالک و پودر تالک + سبوس برنج (10^6 cfu/g) و فرمولاسیون پودر تالک + خاک اره (6×10^3 cfu/g) بود. همچنین بیشترین و کمترین جمعیت جدایه D35 به ترتیب در فرمولاسیون پودر تالک + سبوس برنج (10^6 cfu/g) و فرمولاسیون پودر تالک + خاک اره (10 cfu/g) مشاهده شد. در مجموع فرمولاسیون پودر تالک + سبوس برنج توانستند در مدت 150 روز (5 ماه) جمعیت قابل

قبولی از هر دو جدایه D33 و D35 را در خود حفظ کنند (10^6cfu/g). این درحالی بود که فرمولاسیون پودر تالک + خاک اره نتوانست جمعیت مناسبی از باکتری‌ها را در انتهای زمان آزمون بر روی خود نگه دارد (کاهش جمعیت D33 و D35 از 10^8 به‌ترتیب به 6×10^3 و 10 سلول باکتری بر گرم فرمولاسیون).

استفاده از باکتری‌های محرک رشد ممکن است تحت شرایط مزرعه بدلیل اثر نامطلوب عوامل محیطی، تأثیری متوسط تا بی‌اثر داشته باشد. بنابراین قبل از رهاسازی این عوامل به خاک، باید اقداماتی انجام شود که پایداری، کارایی و رشد عوامل میکروبی را در شرایط طبیعی افزایش دهد. از این رو اغلب این عوامل زیستی را در فرمولاسیون‌های مناسبی قرار می‌دهند، تا از قدرت ماندگاری بهتری برخوردار شوند. برای دستیابی به ماندگاری مناسب، این عوامل زیستی در حامل‌هایی فرموله شده تا بتوانند در شرایط نامساعد خاک و یا سطح بذر زنده مانده و تا ظهور ریشه‌ها جمعیت خود را حفظ نمایند (ناکران و همکاران، 2005).

یکی از جنبه‌های بسیار مهم در مطالعات مربوط به کودهای زیستی، نوع فرمولاسیون آنها می‌باشد (ملین و همکاران، 2007). تالک یک ماده معدنی طبیعی است که در صنعت به صورت پودر استفاده می‌شود و دامنه کاربرد وسیعی دارد. پودر تالک به دلیل ماهیت خنثی و جذب رطوبت پایین، مانع از تشکیل پل‌های هیدراته شده طول دوره انبارداری را کاهش می‌دهد لیکن به دلیل دردسترس بودن، از تالک به‌عنوان یک ماده خام و در نقش حامل در تولید فرمولاسیون‌ها استفاده می‌شود (سیواکومار و همکاران، 2012). کینای و یلدیز (2008) گزارش دادند جمعیت سلول زنده در فرمولاسیون‌های حاوی پودر تالک و کائولین به عنوان مواد حامل، با زمان کاهش یافت. آنها نشان دادند پس از گذشت شش ماه، فرمولاسیون پودر تالک در مقایسه با فرمولاسیون کائولین دارای تعداد سلول زنده بالاتری بود که بیانگر موثر و مفید بودن پودر تالک به‌عنوان یک حامل خوب است. جم هالکار و شارما (2013) نشان دادند که فرمولاسیون مبتنی بر تالک جدایه *Pseudomonas fluorescens* RRB-11 حداکثر ماندگاری و زنده ماندن در ریزوسفر را داشت و توانست شدت بیماری سوختگی باکتریایی برنج را کاهش داده، عملکرد گیاه را افزایش دهد.

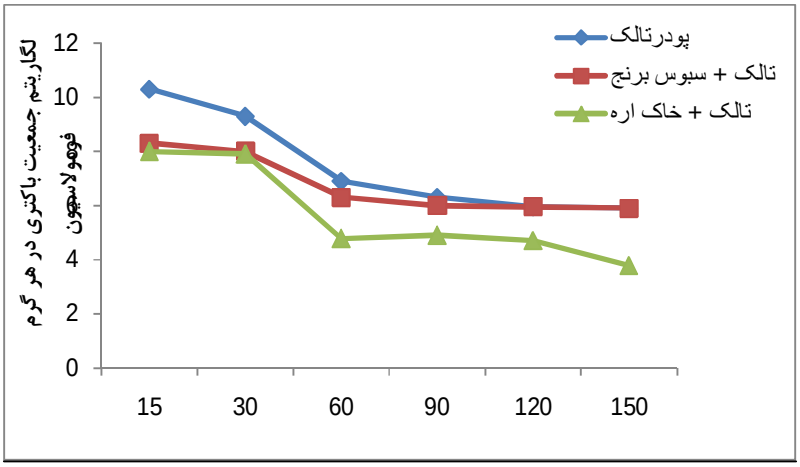
در تحقیقی دیگر که بر روی فرمولاسیون‌های مبتنی بر تالک عوامل بیوکنترل *Trichoderma viride*، *Trichoderma harzianum*، *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* انجام شد، مشخص گردید که بیشترین نرخ زنده‌مانی قارچ‌های تریکودرما در فرمولاسیون تالک و باکتری‌ها در فرمولاسیون تالک + کود دامی و 120 روز بعد از ذخیره‌سازی بود (پاراماسیوان و همکاران، 2019).

سبوس برنج به طور طبیعی مقادیر بالایی سیلیس دارد که از آن به عنوان جایگزینی برای پرلیت در چند سال گذشته استفاده شده است (اوانس و گاچوکیا، 2004). در تحقیقی گزارش شد که پودر تالک حامل مناسبی برای فرمولاسیون باکتری‌ها است، لیکن افزودن سبوس برنج به پودر تالک می‌تواند ضمن نگه‌داری رطوبت بیشتر، در تغذیه ریزجاندار نیز نقش داشته باشد (مختار نژاد و همکاران، 1390). در تحقیقی که بر روی فرمولاسیون باکتری‌های سودوموناس فلورسنت و حامل‌های مختلف آلی و معدنی انجام شد مشخص گردید که فرمولاسیون‌های آلی (سبوس برنج و باکتری سودوموناس فلورسنت) موثرتر از فرمولاسیون‌های معدنی (فرمولاسیون پودر تالک و باکتری سودوموناس فلوروسنت) بودند (اردکانی و همکاران، 2010).

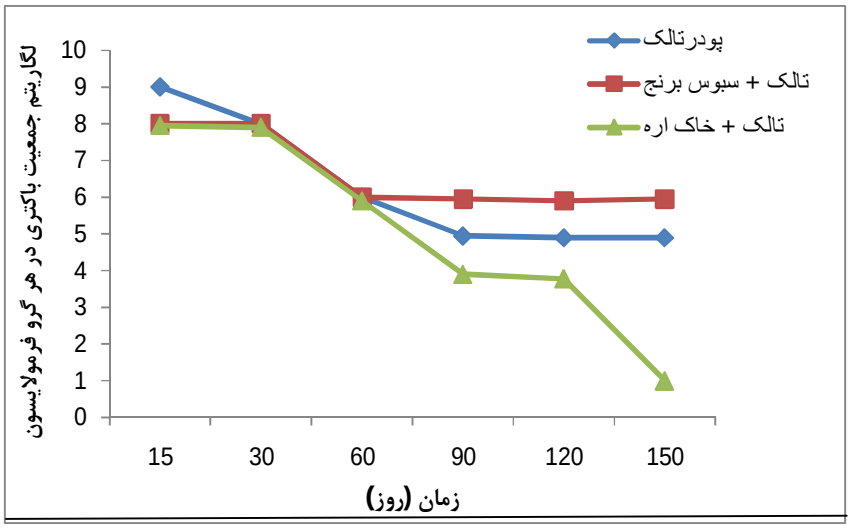
خاک اره دارای نسبت کربن به نیتروژن بالایی است اما قیمت ناچیز، وزن اندک، فراوانی و در دسترس بودن آن در کشور یک مزیت مهم محسوب می‌شود (کولا و همکاران، 2003). از این رو بنظر می‌رسید خاک اره بتواند به عنوان حاملی مناسب برای فرمولاسیون عوامل میکروبی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در بین حامل‌های مورد آزمایش، خاک اره دارای

کمترین میزان زنده مانی برای باکتری بود. این کاهش را می‌توان به خواص فیزیکی و شیمیایی آن نسبت داد. در واقع با وارد شدن باکتری به محیط جدید، تنش‌های لحظه‌ای متفاوتی به جمعیت باکتری وارد می‌گردد که باعث می‌شود حامل‌های مختلف تاثیر متفاوتی بر جمعیت باکتری‌ها داشته باشند (قاسمی پیرانلو و همکاران 1398).

عمر انبارداری باکتری‌ها در فرمولاسیوهای مختلف، بسته به جنس باکتری، مواد حامل و اندازه ذرات آنها متفاوت است (احمد زاده و همکاران 1393). بنظر می‌رسد تفاوت در رفتار فرمولاسیون‌های مورد آزمون برای دو جدایه D33 و D35 نیز به همین دلیل باشد. انواع مواد کمکی که در تولید فرمولاسیون به‌کار می‌رود در بهبود و کارایی آن نقش دارند. ماندگاری عوامل میکروبی در فرمولاسیون‌ها با اضافه کردن مواد کمکی (روغن‌ها، چسباننده‌ها و امولسیون‌ها) می‌تواند افزایش یابد. این مواد کمکی با تهیه ذخایر غذایی و محافظت از عوامل میکروبی در برابر خشک شدن و مرگ، باعث افزایش ماندگاری آنها می‌شوند (احمد زاده و همکاران 1393). در تحقیقی نشان داده شد که تغییر ترکیب مواد غذایی داخل فرمولاسیون، بقا و ماندگاری سودوموناس فلوروسنت را افزایش داد ولی کارایی و اثربخشی آن را بیشتر نکرد (احمد زاده و همکاران 1393).



شکل 1- روند تغییرات جمعیت جدایه D33 در فرمولاسیون‌های مختلف طی مدت نگه‌داری



شکل 2- روند تغییرات جمعیت جدایه D35 در فرمولاسیون‌های مختلف طی مدت نگه‌داری

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد جدایه‌های D33 و D35 که قادر به افزایش حلالیت تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع PKV و کاهش pH محیط کشت بودند توانستند فراهمی فسفر در خاک را نیز در طول مدت آزمون (زمان‌های 15، 30 و 60 روز) به طور معنی‌داری افزایش دهند. همچنین بررسی جمعیت جدایه‌های D33 و D35 در سه فرمولاسیون (پودر تالک، پودر تالک + سبوس برنج و پودر تالک + خاک اره) نشان داد که فرمولاسیون پودر تالک + سبوس برنج احتمالاً می‌تواند به عنوان یک حامل مناسب برای هر دو جدایه D33 و D35 مورد استفاده قرار گیرد. این فرمولاسیون توانست برای مدت 150 روز (5 ماه) جمعیت قابل قبولی از باکتری معادل 10^6cfu/g را در خود نگه دارد. البته برای تأئید کارایی این فرمولاسیون به عنوان یک کود زیستی فسفره نیاز به انجام آزمون‌های کلخانه‌ای و مزرعه‌ای می‌باشد.

فهرست منابع:

1. احمد زاده، م.، صابری، ر. و عسکری‌نیا، م. 1393. تکنولوژی تولید فرمولاسیون و کاربرد پروبیوتیک‌های گیاهی در کشاورزی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران.
2. خوشرو، ب.، ساریخانی، م. ر. 1397. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاتی. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). جلد 3 (شماره 1)، 155-167
3. ضیائیان، ا.، سلیم پور، س.، سیلسی پور، م. و صفری، ه. 1388 . ارزیابی برخی از کودهای زیستی و شیمیایی فسفره روی ذرت.اولین کنگره چالش های کود در ایران: نیم قرن مصرف کود. 10-12 اسفند، تهران، ایران.
4. قاسمی پیرانلو، ف.، ساریخانی، م. و نجفی، ن. 1398. بررسی زنده مانی باکتری *Enterobacter cloacae* در چند حامل جامد و اثر زادمایه های تهیه شده بر جوانه زنی و رشد گندم. جلد 29 (شماره 3)، 167- 180.
5. مختارنژاد، ل.، اعتباریان، ح.، فاضلی، م. ر. و خوشایند، م. ر. 1390 بررسی تأثیر مواد افزودنی مختلف روی ماندگاری مخمر *Pichia guilliermondii* در حامل‌های پودری و کارایی آنها در کنترل کپک آبی سیب. مجله بیماری‌های گیاهی. جلد 47 (شماره 4)، 435-446.
6. Antoun, H. 2002. Field and green house trials performed with phosphate solubilizing bacteria and fungi. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca University 16:235-237.
7. Ardakani, S. S., Heydari, A., Kohorasani, N. and Arjmandi, R. 2010. Development of New Bioformulation of *Pseudomonas Fluorescens* and evaluation of these products against damping-off of cotton seedlings. Journal of Plant Pathology 92(1):83-88.
8. Bashan, Y., Kamnev, A. A., de Bashan, L. E. 2013. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. Biology and Fertility of Soils 49:1-2
9. Bora, T., Ozakan, H., Gore, E. and Aslan, E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettabe powder formulation of two strain of *Pseudomonas putida*. Journal of Phytopathology 152: 471-475.
10. Bouyoucos, G. J. 1951. A recalibration of hydrometer method for making mechanical analysis of soil. Agronomy Journal 43(9):434-438.
11. Colla, G., Rea, E., Pierandrie, F. and Salerno, A. 2003. Effects of substrates on yield quality and mineral composition of soilless grown cucumbers. Acta Horticulturae 614:205-209.

12. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant growth promoting effects of diazotroph sinthe rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences 22(2):107–149.
13. Dubey, S. K. and Billore, S. D. 1992. Phosphate solublizing microorganism as inoculant and their role in augmenting crop productivity in India: A review Crop Research Hisar 5(11):1-11.
14. Evans, M. R. and Gachukia, M. 2004. Fresh parboiled rice hulls serve as an alternative to perlite in greenhouse crop substrates. Horticultural Science 39(2):232-235.
15. Fageria, N. K. 2009. The use of nutrients in crop plants.CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.USA. New York.
16. Fernandez, L. A., Zalba, P., Gomez, M. A. and Sagardoy, M. A. 2007. Phosphate solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under green house condition. Journal of Biology Fertility Soils 43(6):805- 809.
17. Gupta, M. S., Kiran, H., Gulati, A., Singh, B. and Tewari, R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of Aloe barbadensis. Miller Microbiological Research 167(6):358-363.
18. Gyaneshwar, P., Naresh, K. G., Parekh, L. J. and Poole, P. S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil 245(1):83–93.
19. Hameeda B, Rupela OP, Reddy G. and Satyavani K, 2006. Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of pearl millet (*Pennisetumglaucum* L.). Biology and Fertility of Soils, 44: 260-266.
20. Harvey, P. R., Warren, R. A. and Wakelin, S. 2009. Potentialto improve root access tophosphorus: the role of non-symbiotic microbial inoculants in the rhizosphere. Crop and Pasture Science 60(2):144–151.
21. Jambhulkar, P. P. and Sharma. P. 2013. Development of bioformulation and delivery system of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial leaf blight of rice (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Journal of Environmental Biology 35: 843-849.
22. Jeon, J., Lee, S., Kim, H., Ahn, T. and Song, H. 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. Journal of Microbiology and Biotecnology 41(4):271–276.
23. Jorjani, M., Heydari, A., Zamanizadeh, H. R., Rezaee, S. and Naraghi, L. 2010. Development of Pseudomonas fluorescens and *Bacillus* coagulans based bioformulations using organic and inorganic carriers and evaluation of their influence on growth parameters of sugar beet. Journal of Biopesticides 4(2):180-185.
24. Khoshru, B., Sarikhani, M. R., Aliasgharzad N. and 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
25. Kiani Ersi, M., Noue Parast, M., and Amini, A. 2010. Concentration of Sedimentary phosphate ore using shaking table and leaching with acetic acid. International Conference on Mining. October 18 -21.
26. Kinay, P. and Yildiz, M. 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of Metschinkowia pulcherrima and Pichia guilliermondii yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. Biological Control 45:433-440.
27. Kloepper, J. W., 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting Jr, F.B. (ed.), Soil Microbial Ecology: Application in Agricultural and Enviromental Management, Marcel Dekker, New York, pp. 255-274.
28. Kumatha, K., Sempavalan J. and Santhanakrishnan, P. 2004. Effect of Insoluble Phosphate and Dual Inoculation on Soybean. In: Biofertilizers Technology, Kannaiyan, S., Kumar, K. and Govindarajan, K. (Eds.). Jodhpur Scientific Publisher, India, pp: 354-358.

29. Lavakusha, J. Y., Verma, J. P., Jaiswal, D. K. and Kumar, A. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). Ecology Engineering 62:123–128.
30. Liu, F. P., Liu, H. Q., Zhou, H. L., Dong, Z. G., Bai, X. H., Bai, P. and Qiao, J. J. 2014. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in Tropical soils. Biology and Fertility Soils 50(6):927–937.
31. Malboobi, M. A., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S., Yakhchali, B., Deljou, A. and Morabbi Heravi, K. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. The World Journal of Microbiology and Biotechnology 25:1471-1477
32. Malusá, E., Sas-Paszt, L., and Ciesielska, J. 2012. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. The Scientific World Journal 23:1-12.
33. Melin, P., Håkansson, S., Eberhad, T. H. and Schnürer, S. 2006. Survival of the biocontrol yeast Pichia anomala after long-term storage in liquid formulations and different temperatures, assessed by flow cytometry. Journal of Applied Microbiology 100:264-271.
34. Melin, P., Håkansson, S. and Schnürer, S. 2007. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. Applied Microbiology and Biotechnology 73: 1008–1016.
35. Nakkeeran, S., Fernando, D.W.G. and Siddiqui, Z. A. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope. In: Siddiqui, Z. A. (ed). PGPR: biocontrol and bio-fertilization. Springer, Dordrecht, pp 257-296.
36. Norrish, K. and Rosser, H. 1983. Mineral Phosphate. In: Soils, an Australian Viewpoint. Illustrated Edition. Academic Press Melbourne, CSIRO/London, UK, Australia.
37. Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. and Dean, L. A. 1954. Estimation of available phosphorous in soils by extraction with NaHCO3. United States Department of Agriculture, Washington.
38. Paramasivan, M., Thaveedu, S., Mohan, S. and Muthukrishnan, N. 2019. Survival ability of *Trichoderma* spp and *Pseudomonas* in Different carrier Materials. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8:1539-1546.
39. Raghothama, K. G. and Karthikeyan, A. S. 2005. Phosphate acquisition. Plant and Soil compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens*. Current Science 82(12):1463-1466.
40. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Latif, F. 2004. Organic acids productions by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biology Science 7(2):187-196.
41. Richardson, A., E. Barea, J., M. Neill, M. c., Prigent, A. M. and Combaret, C. 2009. Acquisition Of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant and Soil 321(2):305-339.
42. Sarikhani, M. R., 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.
43. Schisler, D. A., Slininger, D. J., Behle, R. W. and Jakson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant disease. Journal of Phytopathology 94(11):1267-1271.
44. Selvi, K. B., Paul, J. J. A., Vijaya, V. and Saraswathi, K. 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. Biochemistry and Molecular Biology Journal 3(1):1-9.

45. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. and Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilising microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus a Springer Open Journal 2(1):587.
46. Sivakumar, G., Josephrajkumar, A. and Rangeshwaran,R. 2012. Bioefficacy of peat formulation of bacterial antagonists on growth promotion and disease suppression in cardamom (*Elettaria cardamomum Maton*). Journal of Biological Control 26: 255-259.
47. Susilowati, L.E. and Syekhfani, S. 2014. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Pb Contaminated Soils and Their Potential for Dissolving Tricalcium Phosphate. Journal of Degraded and Mining Lands Management 1:57-62.
48. Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255(2):571-586.

The ability of fluorescent pseudomonads to increase Bioavailability of phosphorous in soil and study of some formulation from superior isolates

A. Akhgar[1], M. Sadeghi Gogheri, P. Abbaszadeh Dahaji and R. Saberi Rice
Associate professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: arakhgar@yahoo.com
Former MSc. student of Vali-e-Asr University of Rafsanjan;
E-mail: maryam_sadeghi175@yahoo.com
Assistant professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: p.abbaszadeh@vru.ac.ir
Associate professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: r.saberi@vru.ac.ir
Received: May, 2020 & Accepted: june, 2021

Abstract

Phosphorus is one of the essential elements for plant growth and increase in the availability of indigenous phosphorus have an effective role in reducing the chemical fertilizers consumption. This study was conducted to investigate some inoculant formulations for phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads for agricultural and environmental uses. For this purpose, 30 isolates belong to fluorescent pseudomonad group were collected from microbial bank of Faculty of Agriculture of Vali-e-asr University of Rarsanjan. Then ability of all isolates for solubilizing tricalcium phosphate were studied. In addition, the ability of those isolates for increasing phosphorus availability in soil amended with and without phosphate rock at 15, 30 and 60 days was inspected. Finally, the persistence of the selected isolate was evaluated in some inoculant formulations. The results indicated that all isolates were able to increase the solubility of tricalcium phosphate in solid and liquid media of PKV and the pH of culture medium also decreased significantly. The maximum and minimum phosphate solubilization in solid media of PKV were related to isolates D33 and D24 and in liquid media, it was related to isolates D6 and D4 respectively. The results showed that isolates D33 and D35 increased the soil phosphorus bioavailability in 15, 30, 60 day after inoculation by 48, 25, 75% and 72, 50, 26% respectively. The cell numbers of D33 and D35 isolates in three inoculant formulations including talcum powder, talcum+rice bran and talcum+sawdust (180 days after inoculation) indicated that maximum and minimum of cell numbers of D33 were occurred in talcum powder and talcum+rice bran (10^5 cfu/g) and talcum+sawdust (8×10^3 cfu/g) respectively. Maximum and minimum of cell numbers of D35 were observed in talcum+rice bran (10^5 cfu/g) and talcum+sawdust (10 cfu/g) respectively. Finally, inoculant formulation of talcum+rice bran was able to maintained an acceptable cell numbers of both isolates D33 and D35 (10^6 cfu/g) at the end of 150 days.

Keywords: formulation, inoculant, Plant growth promoting rhizobacteria

[1.] Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agricultura, Vali-e-Asr University of Rafsanjan.