



Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology<https://sbj.areeo.ac.ir/>

Research article

Investigating the ability of biofilm formation by bacteria of Barvar 2 phosphate biofertilizer and their effect along with the application of phosphate soil on barley growth

Esmaeil Karimi^{*1}, Sima Aslyazdani², Ezzatallah Esfandiyari³  and Seyed Bahman

Mousavi⁴ 

1- Assistant Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. sm_ka80@yahoo.com

2- M.Sc., Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. s.aslyazdani2020@gmail.com

3- Professor, Department of Plant Production Engineering and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. esfand1977@yahoo.com

4- Associate Professor, Department of Plant Production Engineering and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. b_mosavi2000@yahoo.com

Article Info

Extended Abstract

Received: 2024-12-21

Accepted: 2025-06-28

Keywords: *Pantoea* bacterium, *Pseudomonas* bacterium, Root morphology, Harvest index, Crystal violet, 1000 seed weight

Corresponding author's email:

sm_ka80@yahoo.com

DOI:

10.22092/SBJ.2025.3680
20.273

Background and Objectives: Phosphorus bioavailability in soil is a key issue in plant nutrition, especially in calcareous and acidic soils, where it rapidly forms insoluble compounds. Phosphate-solubilizing bacteria (PSB) have been used as biofertilizers to release available phosphorus from these sources. Barvar 2, a phosphate biofertilizer widely used in the country, contains two strains of phosphate-dissolving bacteria: *Pantoea agglomerans* P25 and *Pseudomonas putida* P13. These bacteria release organic acids, which lower soil pH, chelate minerals, and affect ion exchange reactions to mobilize phosphorus. However, the success of these biofertilizers depends on the bacteria's ability to compete with native soil bacteria and colonize plant roots effectively. This aspect of the biofertilizer's functionality is a concern and requires further study. One key factor influencing root colonization is the ability of bacteria to form biofilms in the rhizosphere. Biofilms enhance bacterial survival and colonization by providing protection against environmental stressors and improving bacterial persistence in the soil. Studies suggest that bacteria capable of forming biofilms are more efficient at colonizing roots and promoting plant growth. Biofilm formation is a desirable trait for growth-promoting bacteria, and its effectiveness varies across different bacterial strains. These bacteria typically form biofilms that help retain moisture and improve their overall survival compared to planktonic forms. Given the importance of phosphorus for cereal production, especially barley, understanding how biofilm formation by PSB bacteria affects plant growth under different phosphorus treatments in calcareous soils is crucial. This study aims to explore the ability of Barvar 2 bacteria to form biofilms and their impact on barley growth when used as a biofertilizer in varying soil conditions.

Materials and Methods: Barvar 2 biofertilizer package prepped from market. Barley seed var. Ansar was obtained from the Dryland Agricultural Research Institute. Barley seeds were disinfected with bleach and alcohol and grown under completely sterile conditions until the two-leaf stage (Zadoks Stage 12) in a minimum salt solution, for extracting root exudates. The biofilm formation by the bacterial components of the biofertilizer in the root exudates was assessed using the crystal violet staining method. In this experiment, TSB medium at a concentration of 0.5 X was used as the control. The ability to dissolve phosphate from a phosphate rock source was performed using liquid Sperber medium over a period of 7 days. To investigate the correlation between biofilm formation ability and barley growth, a pot experiment was conducted in a factorial within a completely randomized design. The treatments were including with and without biofertilizer bacteria, and using powdered phosphate rock at three levels: zero, 6 and, 12 mg/kg of soil. The research was conducted in greenhouse of the Faculty of Agriculture at University of

Maragheh. At the end of the experiment, Yield and yield components, including straw weight, number of grains, plant height, leaf weight, biological yield, harvest index, 1000 seed weight, spike weight, and seed weight, were measured. The data obtained were analyzed using SAS software, and mean comparisons were made at a 5% probability level of Duncan's test.

Results: Our results showed that biofilm-forming ability of the bacteria separately in the barley root exudate medium was higher than in the TSB medium. However, this effect was not observed when the two bacteria were mixed. The biofilm-forming ability of *P. agglomerans* was greater than *P. putida*, and the bacterial mixture affected biofilm formation. Inoculation of the Sperber medium containing phosphate rock with *P. putida* increased the EC of the medium to (110 μ S/cm), whereas inoculation with *P. agglomerans* increased the EC to (528 μ S/cm), compared to the control. However, inoculation of the Sperber medium containing phosphate rock with *P. putida* caused a 2.47-unit drop in pH, and a 3.86-unit drop was observed with *P. agglomerans*, compared to the control. Linear relationships between the traits of grain weight in the pot, thousand-grain weight, and harvest index with the biofilm formation index by the components of the biofertilizer showed a significant correlation with determination coefficients (R^2) of 74%, 97%, and 97%, respectively.

Conclusion: This study sheds light on the importance of bacterial biofilm formation in the context of biofertilizers, particularly when the bacteria are involved in nutrient solubilization from sources like phosphate rocks. The significant correlations (R^2 of 74% for grain weight, 97% for thousand-grain weight, and 97% for harvest index) with the biofilm formation index suggest that biofilm formation by biofertilizer bacteria is closely related to crop yield parameters. This indicates that assessing biofilm formation could serve as an important criterion in evaluating the efficacy of biofertilizers. It also points to the potential for improving crop yield through the strategic use of biofilm-forming bacteria in agricultural systems.

Cite this article: Karimi, E., Aslyazdani, S., Ezzatallah, E., Mousavi, S.B., 2025. Investigating the ability of biofilm formation by bacteria of Barvar 2 phosphate biofertilizer and their effect along with the application of phosphate soil on barley growth. *Journal of Soil Biology*, 13 (1), 18-38.



DOI: 10.22092/SBJ.2025.368020.273

Publisher: Soil Science Society of Iran



مقاله پژوهشی

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های موجود در کود زیستی فسفات بارور ۲ و اثر آنها همراه با کاربرد خاک فسفات بر رشد جو

اسماعیل کریمی^{۱*}، سیما اصل یزدانی^۲، عزت‌اله اسفندیاری^۳ و سید بهمن موسوی^۴ 

- ۱- استادیار، بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. sm_ka80@yahoo.com
- ۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. s.aslyazdani2020@gmail.com
- ۳- استاد، فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. esfand1977@yahoo.com
- ۴- دانشیار، پیدایش، رده‌بندی و ارزیابی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. b_mosavi2000@yahoo.com
- دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱ پذیرش: ۱۴۰۴/۴/۷

چکیده

تشکیل بیوفیلم در ریزوسفر گیاهان زراعی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات نامحلول خاک می‌تواند با بهبود کلنیزاسیون ریشه و افزایش حلالیت فسفر موجب افزایش کارآمدی آنها شود. کود زیستی فسفات بارور ۲ حاوی باکتری‌های *Pantoea* و *Pseudomonas putida* می‌باشد، که با ترشح اسیدهای آلی و آنزیم فسفاتاز باعث تجزیه ترکیبات فسفر نامحلول در خاک شده و امکان جذب این عنصر را برای گیاهان فراهم می‌کند. تاکنون اطلاعاتی در خصوص قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های این کود گزارش نشده است. برای بررسی این موضوع باکتری‌های این کود جداسازی شده و تشکیل بیوفیلم توسط آن‌ها روی سطح پلاستیکی و در حضور ترشحات ریشه جو ارزیابی شد. سپس توانایی انحلال فسفر این باکتری‌ها با کاربرد پودر سنگ فسفات در محیط کشت اسپربر به‌صورت جداگانه و کنسرسیوم دو باکتری اندازه‌گیری شد. در ادامه آزمایشی گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار با تلقیح جو رقم انصار و ۳ سطح فسفر از منبع خاک فسفات (صفر، ۶ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) طراحی شد و اجزای عملکرد جو در این تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج دادند که باکتری‌های این کود توانستند در حضور ترشحات ریشه گیاه جو بیوفیلم تشکیل دهند. شاخص بیوفیلم در باکتری‌ها به‌صورت فردی و در حالت کنسرسیوم متفاوت بود و بیشترین میزان آن به مقدار ۰/۸۴ در باکتری *P. agglomerans* مشاهده گردید. برقراری رابطه رگرسیونی میان صفات اجزای عملکرد ارزیابی شده، با شاخص تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها نشان داد که شاخص برداشت با ضریب تبیین ۰/۹۷، وزن هزار دانه با شاخص تبیین ۰/۹۷ و وزن دانه در گلدان با ضریب تبیین ۰/۷۴ بهترین ارتباط خطی و مستقیم را با آن دارند. بنابراین به‌نظر می‌رسد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌تواند به عنوان یک استراتژی مؤثر در بهبود کارایی کودهای زیستی و افزایش جذب فسفر توسط گیاه جو و احتمالاً سایر گیاهان زراعی مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه: باکتری پانتوا، باکتری سودوموناس، ریخت‌شناسی ریشه، شاخص برداشت، کریستال ویوله، وزن هزار دانه.

مقدمه

فسفر یکی از مهمترین عناصر پرمصرف ضروری برای رشد گیاهان بوده و قابلیت دسترسی زیستی فسفر به-عنوان یک عنصر پرمصرف در خاک‌های کشور یکی از چالش برانگیزترین موارد مهم در تغذیه گیاهان می‌باشد (Asadi et al., 2022). قابلیت دسترسی زیستی فسفر به شدت به pH خاک وابسته بوده و در خاک‌های اسیدی و آهکی به سرعت با ورود به ساختارهای نامحلول از دسترس گیاهان خارج می‌شود. این موضوع نه تنها فسفر خاک بلکه یکی از مهمترین مشکلات کاربرد کودهای حاوی عنصر فسفر را نیز در بر می‌گیرد. درحقیقت، فسفر محلول با کاتیون‌هایی مانند Ca^{2+} ، Mg^{2+} ، Fe^{3+} و Al^{3+} یا کربنات کلسیم، اکسید آلومینیوم و اکسید آهن وارد واکنش شده و به سرعت به اشکال نامحلول رسوب می‌کند (Leytem and Westermann, 2003). با عنایت به آهکی بودن اغلب خاک‌های کشور تخمین زده می‌شود که بالغ بر ۸۰ درصد کودهای فسفر به شکل رسوب در آمده که موجب کاهش کارایی آنها می‌گردد. این مهم در حالی اتفاق می‌افتد که منابع تولید کودهای فسفوری در کشور وارداتی بوده و سالیانه ارز زیادی از کشور خارج می‌شود (Rejali et al., 2014). تجربه سالیان اخیر در کشور نشان داده که تامین این عنصر با توجه به مسایل سیاسی، مشکلاتی را در بخش کشاورزی ایجاد نموده است و این مهم با توجه به منابع محدود ذخایر فسفات در جهان که طی ۵۰ تا ۱۰۰ سال آینده تمام خواهد شد (Kauwenbergh, 2010) دور نمای تاریکی را پیش روی کشور قرار داده است. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از پتانسیل‌های میکروبی خاک در این زمینه می‌تواند به عنوان یک راه حل اساسی مورد توجه قرار گیرد (Fallah Nosratabad and Khoshru, 2024). با تکیه بر این امر، کود زیستی بارور ۲ در کشور ایران به عنوان یک کود میکروبی جهت کمک به تغذیه گیاهان با استفاده از منابع نامحلول فسفر در خاک تولید و روانه بازار

شده است. این کود حاوی دو نوع باکتری حل‌کننده فسفات^۱ به نام‌های *Pseudomonas putida* P13 و *Pantoea agglomerans* P25 می‌باشد که قادر هستند با ترشح اسیدهای آلی و پی‌آمد آن کاهش pH خاک، کلاته نمودن و دخالت در واکنش‌های تبدیلی، فسفات غیر قابل جذب را آزاد و در اختیار گیاه قرار دهند (Khan et al., 2020). از آنجایی که با توجه به افزایش چشمگیر قیمت کودهای شیمیایی فسفره این نوع کودها مورد توجه کشاورزان قرار گرفته است و در عین حال قابلیت رهاسازی فسفر توسط این باکتری‌ها به عوامل گوناگونی مانند نوع گیاه، رقم گیاه، میزان فسفر قابل دسترس خاک و سایر عوامل بستگی دارد (Rehman et al., 2020). انجام تحقیقات در خصوص بهینه‌سازی عوامل موثر بر تاثیر آنها می‌تواند زمینه کاهش موثر مصرف کودهای شیمیایی را فراهم نماید (Tohidinia et al., 2014). توان رقابت باکتری‌های این کودها با جمعیت بومی ساکن خاک و کلنیزاسیون موفق ریشه گیاه توسط آن یکی از نقاط تاریک تلقیح گیاهان با این نوع کودها محسوب می‌شود که می‌تواند به شدت بر پاسخ گیاهان به کاربرد کود زیستی موثر باشد (Karimi et al., 2023). بنابراین این موضوع شایسته توجه بوده و بایستی مورد مطالعه قرار گیرد (Fallah, 2022). توانایی تشکیل بیوفیلم^۲ در ریزوسفر توسط باکتری‌ها یکی از ویژگی‌های مطلوبی است که بر طبق نتایج برخی از مطالعات انجام شده گمان می‌رود باکتری‌های مولد آن در امر کلنیزاسیون ریشه گیاهان موثرتر عمل نمایند (Beauregard et al., 2013). به عبارت دیگر احتمال می‌رود، کلنیزاسیون موفق ریشه گیاه و افزایش زنده‌مانی باکتری در مقابل شرایط نامساعد محیطی از جمله خواص منتج از تشکیل بیوفیلم باکتریایی باشد (Joshi et al., 2021) و بنابراین نتایج حاصل از تلقیح با آنها نیز بهتر خواهد بود (Habibi et al., 2022). تلقیح گیاه جو با باکتری *B. amyloliquifaciens* با تشکیل بیوفیلم در

^۲ Biofilm formation^۱ Phosphate solubilizing bacteria (PSB)

ریزوسفر توانست موجب افزایش ۲۳ درصدی وزن خشک ریشه و ۴۳ درصد رشد ساقه را افزایش دهد (Kasim et al., 2016). در شرایط تنش کم‌آبی گزارش شده است که تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی با باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم *B. amyloliquefaciens* 54 توانسته است با بهبود محتوای رطوبت نسبی در برگ‌ها به افزایش عملکرد آن کمک نماید (Wang et al., 2019). یافته‌های کریمی و همکاران (Karimi et al, 2022) نشان داد که تلقیح چاودار با باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم *Bacillus atrophaeus* توانست با ممانعت از ورود کادمیوم به گیاه موجب افزایش عملکرد آن در شرایط آلودگی کادمیم شود.

بیوفیلم‌ها ساختارهایی هستند که به سبب ماهیت پلی‌ساکاریدی که دارند علاوه بر اینکه باعث جذب رطوبت و عملکرد بهتر گیاه می‌شوند، در اثر تشکیل کمپلکس میان اگزوپلی‌ساکاریدهای موجود در ساختار بیوفیلم با یون‌های Al^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{2+} , Fe^{+3} , Mg^{+2} و K^{+} میزان فسفر قابل دسترس در خاک افزایش پیدا می‌کند (Ochoa-Loza et al., 2001). بر این اساس گزارش شده است که باکتری‌هایی با توان مطلوب در تشکیل بیوفیلم می‌توانند موجب افزایش ۱۵ برابری فسفر قابل جذب در خاک شوند (Seneviratne and Jayasinghearachchi, 2005). اگر چه تشکیل بیوفیلم توسط اغلب باکتری‌ها انجام می‌شود و زندگی بیوفیلمی نسبت به زندگی پلانکتونی (آزادی) ارجحیت دارد. ولی با این حال قدرت تشکیل بیوفیلم در آن‌ها متفاوت بوده و متعاقب آن تأثیرات ناشی از کاربرد این نوع باکتری‌ها به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد تأثیرات متفاوتی را در پی خواهد داشت (Karimi et al., 2022). در گیاه برنج تلقیح شده با باکتری *Serratia marcescens* تشکیل بیوفیلم در ریزوسفر توسط این باکتری یک راهکار موثر در حلالیت فسفر گزارش شده است (de Oliveira et al., 2024). همچنین مشخص شده که تشکیل بیوفیلم قوی توسط باکتری‌های رشته ای در اطراف هیف‌های میکوریز *Rhizoglossus irregularis* (DAOM 197198) می‌تواند در مقایسه

با باکتری‌های که قدرت چسبندگی و توانایی تشکیل بیوفیلم اندکی داشتند فسفر را به شکل موثرتری در خاک از منابع نامحلول آن آزاد نماید (Taktek et al., 2017) تولید غلات به ویژه جو اهمیتی حیاتی برای کشور داشته و برای تولید مطلوب نیازمند کاربرد کودهای فسفر می‌باشند. هیچگونه اطلاعاتی در خصوص توان تشکیل بیوفیلم یا کلنیزاسیون ریشه گیاه جو با باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ گزارش نشده است لذا با توجه به اهمیت تشکیل بیوفیلم به‌عنوان معیاری از توان کلنیزاسیون، هدف از این مطالعه در ابتدا بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ در برهمکنش با این گیاهان و سپس تأثیر تلقیح این باکتری‌ها بر رشد جو در شرایط مختلف تیمارهای کودی با خاک فسفات به عنوان غالب‌ترین منبع فسفر نامحلول در خاک‌های آهکی بود. همچنین انتظار می‌رود نتایج حاصل از این مطالعه بتواند در بهبود تولید سایر کودهای زیستی موثر باشد.

مواد و روشها

تهیه کود و جداسازی باکتری

کود زیستی فسفات بارور ۲ تازه تولید شده از بازار تهیه و باکتری‌های آن در آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه مراغه جداسازی شدند. بر طبق اطلاعات موجود در سایت اینترنتی تولیدکننده کود زیستی فسفات بارور ۲ حاوی 10^7 تا 10^8 باکتری حل کننده فسفات در هر گرم از محصول است که با تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز در اطراف ریشه باعث آزاد شدن یون فسفات می‌شوند.

تهیه بذر جو و جمع‌آوری ترشحات ریشه

بذر جو رقم انصار از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (ایستگاه تحقیقاتی مراغه) تهیه شد. جهت ضدعفونی سطحی بذور تعداد ۵۰ عدد بذر یک‌نواخت به مدت یک دقیقه در داخل آب حاوی مایع ظرفشویی شستشو داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در وایتکس ۵ درصد

(برند اکتیو) غوطه‌ور شدند، سپس شستشو داده شده و به مدت دو دقیقه در قارچ‌کش ۲ درصد غوطه‌ور و چهار بار شستشو داده شدند، بعد از آن بذور به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد (برند رازی) غوطه‌ور و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (Karimi et al., 2023). بذور ضدعفونی شده روی کاغذ خشک استریل داخل پتری‌دیش استریل ریخته شده و ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به داخل آن افزوده شد. پس از رشد بذور و ظهور جوانه و ریشه‌ها پس از ده روز در شرایط این آزمایش با رعایت کلیه اصول استریل گیاهچه‌ها به داخل بطری‌های حاوی محیط نمک معدنی حداقل (MSM^۳) منتقل گردیده و دهانه ظروف با پنبه پوشانده شد، و به مدت یک هفته بر روی شیکر در اتاق کشت در دور کند ۸۰ دور در دقیقه در شرایط نوری ۱۶ ساعت با شدت نور ۸۰۰۰ لوکس و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد کردند. پس از کدر شدن محیط‌های کشت ناشی از ورود ترشحات ریشه در عین ارزیابی رشد مطلوب تا مرحله دو برگگی، گیاهچه‌ها حذف و ترشحات مذکور به عنوان ترشحات ریشه مورد استفاده قرار گرفتند (Valetti et al, 2018).

ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم در حضور و عدم حضور ترشحات

توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها بر مبنای روش Stepanović و همکاران (2007) با اندکی تغییر در روش انجام شد. برای این منظور ابتدا یک لوپ پر از اسلنت هر باکتری به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت سویا براس (TSB^۴) تلقیح و این لوله به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، در داخل شیکر انکوباتور در ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت استریل (TSB 0.5 X حاوی یک درصد گلوکز) و ۰/۵ میلی‌لیتر ترشحات

ریشه به صورت مجزا درون میکروتیوب‌های پلاستیکی ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد و به مدت ۱۴ الی ۱۶ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. سپس، محتوای داخل میکروتیوب‌ها تخلیه و سه بار با سرم فیزیولوژیک استریل به آرامی شستشو داده شدند تا سلول‌های غیر متصل به دیواره میکروتیوب‌ها خارج شوند. سپس تثبیت سلول‌ها با گذاشتن این میکروتیوب‌ها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در آون به مدت یک ساعت انجام شد. در ادامه کار میکروتیوب‌ها با ۰/۵ میلی‌لیتر کریستال ویوله ۰/۲ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، رنگ‌آمیزی شدند. بعد از ۳۰ دقیقه، چاهک‌ها با آب شهری به آرامی شسته شده و با ۰/۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۱۱ درصد به عنوان حلال، پر شدند. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۲۰۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب‌ها به آرامی به میکروپلیت منتقل شده و مقدار جذب نوری در چاهک‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر، توسط دستگاه ELISA Reader Mpr4 هاپیروین آلمان خوانده شد.

ارزیابی توانایی انحلال فسفات، تغییرات pH و

هدایت الکتریکی در محیط کشت

کشت تازه ۱۲ ساعته باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت براث (NB) تهیه شده و برای بررسی توان حل‌کنندگی فسفات آن، هر باکتری با سه تکرار در محیط کشت اسپربر مایع^۵ استریل (۱۰ گرم گلوکز، ۲/۵ گرم پودر خاک فسفات، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم و ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم در یک لیتر) تلقیح شد. اسیدیته محیط کشت پیش از استریل کردن و تلقیح باکتری‌ها، روی ۷ تنظیم شد. ارلن‌هایی با ظرفیت ۳۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اسپربر با ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری‌های ذکر شده تلقیح شدند. نمونه‌های دارای باکتری و شاهد (بدون باکتری) برای یک هفته در

^۵ Liquid Sperber medium

^۳ Minimum Salt Media

^۴ Tryptic Soy Broth

کیلوگرم) از منبع خاک فسفات تولیدی داخل کشور توسط شرکت پارس شیمی بود، که در ۳ تکرار انجام شد. تلقیح باکتری در مرحله جوانه‌زنی توسط این باکتری‌ها به صورت جداگانه و کنسرسیوم با جمعیت (10^9 cfu ml⁻¹) انجام شد. ویژگی‌های خاک مورد استفاده در کشت گلدانی در جدول (۱) آورده شده است. میزان پتاسیم این خاک به روش عصاره‌گیری با استفاده از استات آمونیوم و توسط دستگاه فلیم‌فوتومتر شرکت شروود مدل M410، فسفر به روش عصاره‌گیری با بی‌کربنات سدیم و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-1800 شیمادزو، آهن به روش تیتراسیون، میزان هدایت الکتریکی و pH در عصاره گل اشباع بر اساس روش کار ارایه شده توسط سازمان تحقیقات خاک و آب کشور اندازه‌گیری شدند (Ali-Ehiayi and Behbahani, 1993). برای اندازه‌گیری رطوبت ظرفیت مزرعای میزان مشخصی از خاک در یک گلدان با زه‌کش مناسب قرار گرفته و با آب اشباع گردید. اختلاف وزن آن پس از گذشت ۲۴ ساعت با وزن اولیه اشباع به عنوان ظرفیت مزرعای در نظر گرفته شد. این خاک قبل از کاشت به میزان لازم به غیر از فسفر جهت تامین عناصر دیگر با توجه به نیاز غذایی گیاه جو بر اساس دستورالعمل فنی تهیه شده توسط موسسه تحقیقات کشاورز دیم کشور جهت زراعت جو دیم در مناطق مختلف کشور کوددهی گردید. بر این اساس در گلدان‌های دارای ۵ کیلوگرم خاک در این پژوهش ۰/۱۱ گرم کود اوره و ۱/۵ گرم کود سولفات پتاسیم افزوده شد.

شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ در دقیقه تکانده شدند. برای برداشت نمونه از محیط کشت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس از بخش رویی آن نمونه‌برداری شد. فسفر به روش آبی (روش آسکوربیک‌اسید-مولیدات) اندازه‌گیری شد. در پایان، ۲/۵ میلی‌لیتر عصاره آماده‌شده برداشته و با ۴ میلی‌لیتر محلول کاری آمونیوم‌هپتامولیدات، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید کنسرسیوم شد و هم‌زمان، استانداردها نیز آماده شدند. پس از ۱۵ دقیقه شدت رنگ در طول موج ۷۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-1800 شیمادزو خوانده شد. در خاتمه این آزمایش، میزان هدایت الکتریکی با دستگاه EC متر ۴۵۱۰ Jenway و اسیدیته محیط‌های کشت مجدداً با پی‌اچ متر ۳۵۲۰ Jenway اندازه‌گیری شدند (Ebrahimi et al., 2018).

پژوهش‌های گلخانه‌ای

به منظور بررسی تأثیر تلقیح باکتری‌های مورد استفاده بر عملکرد گیاه جو در آزمایشی گلدانی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه پژوهشی دانشکده کشاورزی مراغه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۶۰٪ انجام شد. تیمارهای این پژوهش شامل چهار سطح باکتریایی (تلقیح باکتریایی *P. agglomerans*، *P. putida* و کنسرسیوم دو باکتری و عدم تلقیح) و سه سطح فسفر (صفر، ۶ و ۱۲ میلی‌گرم بر

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش گلدانی

Soil texture	Field capacity (%W/W)	pH	EC μs/M	TNV %	Available P mg/Kg	Available K mg/Kg
لوم‌شنی	۱۶/۹	۷/۸	۵۲۳	۸	۶/۰۵	۷۵

در داخل پارچه نمدار استریل قرار گرفتند تا جوانه‌زنی ابتدایی انجام شود. جهت تولید مایه تلقیح از باکتری‌های فوق و تلقیح بذور گندم، یک لوپ از اسلنت حاوی باکتری در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح گردید. پس از رسیدن جمعیت باکتری به 10^9 واحد تشکیل دهنده کلونی

سطح بذور قبل از کاشت با وایتکس ۱۰٪ به مدت ۵ دقیقه و شستشوی مکرر با آب مقطر استریل و سپس غوطه‌ور سازی به مدت ۴۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و شستشوی مکرر با آب مقطر استریل تا رفع بوی وایتکس و الکل ضد عفونی سطحی شدند. این بذور به مدت ۲۴ ساعت

در میلی‌لیتر (تخمین با روش مک فارلند) سوسپانسیون باکتریایی در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل، به آرامی در ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول استریل کلرید سدیم ۰/۱ درصد (وزنی-حجمی)، مجدداً سوسپانسیون شده و برای بذرمال نمودن بذور در حال جوانه‌زنی جو به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید (Mishra and Barolia, 2020).

سپس مطابق با تیمارهای آزمایشی تلقیح باکتریایی انجام گرفت. چهار روز بعد از کشت بذرها، جوانه‌زده تعداد ساقه‌های رشد کرده شمارش شده و ده عدد از هر گیاه در گلدان‌ها باقی ماند. آبیاری گلدان‌ها به صورت وزنی بر اساس کاهش آب، نسبت به رطوبت مزرعه‌ای گلدان انجام گرفت. اندام هوایی جو بعد از رسیدن به مرحله فیزیولوژیکی به صورت کف‌بر برداشت شده و سپس وزن سنبله (دانه + غلاف) و تعداد سنبله و وزن دانه‌ها، وزن ساقه‌ها، تعداد دانه و ارتفاع ساقه، وزن برگ، در انتها وزن هزار دانه و وزن کل اندام هوایی اندازه‌گیری شد. شاخص برداشت نیز از تقسیم وزن دانه در گلدان بر وزن عملکرد زیستی محاسبه گردید (Karimi et al., 2023). سپس خاک گلدان‌ها به آرامی با شستشوی ملایم خاک با آب شهری خارج شده و ریشه‌ها در درون الک دو میلی‌لیتری، با آب شهری خارج شده و آب اضافی ریشه‌ها با دستمال کاغذی دو لایه گرفته شد. وزن تازه ریشه‌ها با ترازوی دقیق تعیین شده و حجم ریشه‌ها با روش جابجایی سیال (آب) به دست آمد. وزن خشک ریشه‌ها پس از قرارگرفتن آن‌ها در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس با ترازو تعیین شده و سایر ویژگی‌های ریشه مانند چگالی بافت ریشه، طول ریشه، سطح ریشه، قطر ریشه و تراکم سطح ریشه به شرح زیر محاسبه شدند (Karimi et al., 2022; Alizadeh, 1999; Naseri et al., 2019; Akhavan et al., 2012):

(۱)

= چگالی بافت ریشه (g cm^{-3})

حجم ریشه (cm^3) / وزن خشک ریشه (g)

(۲)

$0/89 \times \text{وزن ریشه (g)} = \text{طول ریشه (m)}$

(۳)

= سطح ریشه (mm^2)

$^{1/5} (\text{طول ریشه (cm)} \times \pi \times \text{حجم ریشه (cm}^3))^{1/2}$

(۴)

= قطر ریشه (mm)

$^{1/5} (\pi \times \text{طول ریشه (m)} / \text{وزن تازه ریشه (g)} \times 4)$

(۵)

= تراکم سطح ریشه $(\text{cm}^2 \text{ cm}^{-3})^*$

$\pi (\times \text{طول ریشه (m)} \times \text{قطر ریشه (mm)})$

تجزیه آماری داده‌های آزمایشی پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها، با نرم‌افزار MSTAT C انجام شده و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

توانایی تشکیل بیوفیلم

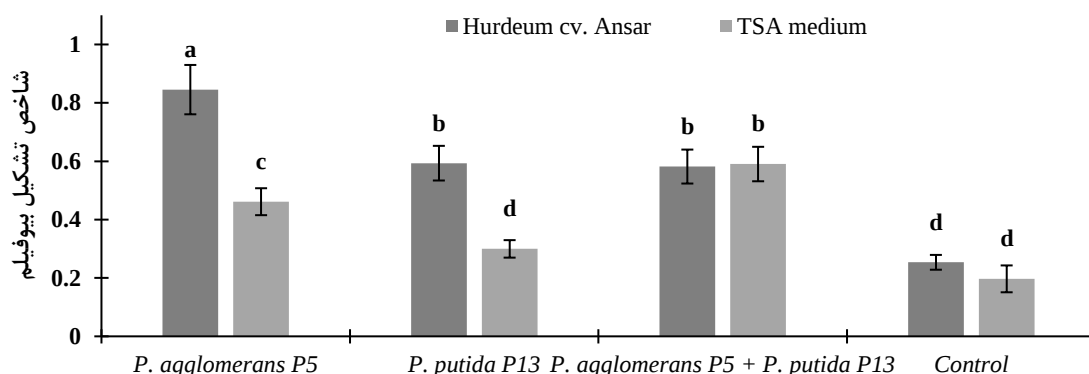
نتایج حاصله نشان دادند که اثر نوع محیط کشت و نوع باکتری در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل باکتری در محیط کشت در سطح احتمال ۵ درصد بر تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های مورد مطالعه معنادار بود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای آزمایشی بر تشکیل بیوفیلم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۳	۰/۵۱۲**
محیط کشت	۱	۰/۰۱۹**
باکتری × محیط کشت	۳	۰/۰۵۲*
خطا	۱۶	۰/۰۳۵
ضریب تغییرات (%)		۱۲/۴۸

* و ** به ترتیب بیانگر معناداری در سطح احتمال ۵ درصد و یک درصد می‌باشند.

بر اساس نتایج مقایسات میانگین (شکل ۱) قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *P. agglomerans* در حضور ترشحات ریشه ۴۲٪ و در محیط کشت TSB ۵۸٪ بیشتر از باکتری *P. putida* بود، اما در کنسرسيوم باکتری از نظر تشکیل بیوفیلم تفاوتی بین محیط کشت‌ها وجود نداشت.



شکل ۱- شاخص تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ در محیط کشت مصنوعی و طبیعی (ترشحات ریشه جو رقم انصار). تیمار کنترل فقط محیط کشت بوده و به آن باکتری تلقیح نشده است.

تقویت می‌کنند. مرحله چسبندگی به شدت وابسته به خصوصیات فیزیکوشیمیایی باکتری وابسته بوده و مختص همان باکتری هست ولی در مرحله هم انباشتگی که مرحله توسعه بیوفیلم می‌باشد، بسیار وابسته به تولید پلی‌ساکاریدها بوده که به عنوان سیمان بین سلولی عمل نموده و باکتری‌ها را در کنار هم نگه می‌دارد (Joshi et al., 2021). کلنیزاسیون ریشه گیاهان زراعی توسط مایه تلقیح‌های معرفی‌شده جهت بهره‌مندی از کارکردهای اکولوژیکی آنها مهم است. نوع باکتری و نوع گیاه در جهت افزایش این توان موثر بوده و پیشنهاد می‌شود که توان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های محرک رشد به‌عنوان معیاری در گزینش

Beauregard و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که زن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم برای کلنیزاسیون ریشه گیاه *Arabidopsis thaliana* با باکتری *B. subtilis* بسیار ضروری هستند و در تشکیل بیوفیلم برخی از پلی-ساکاریدهای گیاهی نقش سیگنالی و محرک در تشکیل بیوفیلم داشته و در عین حال می‌توانند توسط باکتری به-عنوان منبع کربن برای تولید آگزوپلی‌ساکارید در ساختار بیوفیلم استفاده می‌شوند. برای شکل‌گیری و توسعه بیوفیلم‌های چندگونه‌ای، برهمکنش‌های سلول به سلول، که به عنوان چسبندگی^۶ و هم‌انباشتگی^۷ شناخته می‌شوند، ارتباطات متقابل بین سلول‌های مجاور را در یک بیوفیلم

^۷ Co-aggregation^۴ Co-adhesion

آنها و برای گیاهان خاص مورد آزمون قرار گیرد. علاوه بر این رفتارهای متفاوت در تشکیل بیوفیلم توسط کنسرسیون گونه‌های باکتریایی نشان می‌دهد که متابولیت‌های باکتریایی می‌توانند اثرات هم افزایی و یا کاهشی و یا خنثی در تشکیل بیوفیلم داشته باشند لذا این موضوع در تهیه مایه تلقیح‌های چند گونه‌ای بایستی مورد توجه قرار بگیرد.

جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر باکتری‌های کود زیستی بر حلالیت فسفر، هدایت الکتریکی و pH محیط کشت اسپر در مدت هفت

روز				منابع تغییرات
درجه آزادی	فسفر قابل دسترس	هدایت الکتریکی	pH	میانگین مربعات
۲	۱۱/۴۴**	۴۸۹۸۹۶ **	۵۸/۱۰**	باکتری
۴	۰/۰۰۶۵	۱۴۹۴	۰/۹۶۸۶	خطا
	۱۳/۲۵	۸/۶۷	۱۰/۳۵	ضریب تغییرات (%)

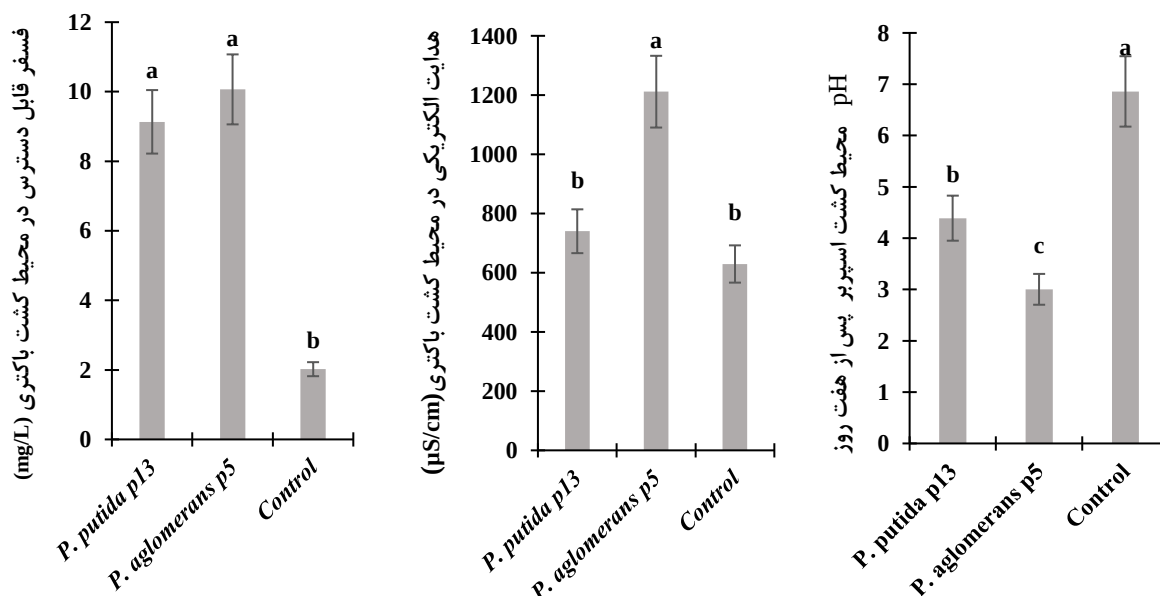
** بیانگر معناداری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

توانایی آزادسازی فسفر از خاک فسفات در محیط

کشت اسپربر مایع

محیط کشت با باکتری *P. agglomerans* موجب افزایش EC برابر با $528 \text{ (S/cm}\mu\text{)}$ در مقایسه با تیمار شاهد گردید. اما تلقیح محیط کشت اسپربر حاوی خاک فسفات با باکتری *P. putida* باعث افت $2/47$ واحدی pH و $3/86$ واحدی pH با باکتری *P. agglomerans* در مقایسه با تیمار شاهد گردیدند (شکل ۲).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر باکتری بر میزان قابلیت دسترسی به فسفر، هدایت الکتریکی و pH محیط کشت در سطح احتمال یک درصد معنادار می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بیانگر آن بود که تلقیح محیط کشت اسپربر حاوی خاک فسفات با باکتری *P. putida* باعث افزایش EC محیط کشت برابر با $110 \text{ (S/cm}\mu\text{)}$ و تلقیح



شکل ۲- تغییرات میزان فسفر قابل دسترس، هدایت الکتریکی و pH در محیط کشت اسپربر توسط باکتری‌های *P. putida p13* و *P. agglomerans p5* پس از ۷ روز. تیمار کنترل بدون افزودن باکتری می‌باشد.

الکتریکی (EC) محیط می‌شود. EC بالاتر نشان‌دهنده افزایش حلالیت و دسترسی به عناصر غذایی مانند فسفر است. با توجه به مکانیسم‌های ذکر شده، کاهش pH و افزایش EC در نتیجه فعالیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات، پدیده‌ای کاملاً منطقی و قابل انتظار است.

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های ریشه جو

در این مطالعه ۹ ویژگی رشدی ریشه مورد مطالعه قرار گرفتند و نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایشی این بخش نشان داد که وزن تر، وزن خشک، حجم، طول، سطح و تراکم سطح ریشه معنادار نشدند. اما اثر تیمارهای آزمایشی بر چگالی بافت، درصد رطوبت ریشه و قطر ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار شدند (جدول ۴).

مشخص شده است که باکتری‌های حل‌کننده فسفات با ترشح اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، اسید گلوکونیک، اسید اگزالیک و اسید مالیک، نقش کلیدی در انحلال منابع نامحلول فسفات در خاک ایفا می‌کنند، این اسیدهای آلی با ایجاد شرایط اسیدی در محیط اطراف ریشه (ریزوسفر)، باعث کاهش موضعی pH می‌شوند. کاهش pH به نوبه خود باعث افزایش حلالیت ترکیبات نامحلول فسفات مانند فسفات‌های کلسیم، آهن و آلومینیوم می‌شود. در نتیجه، فسفر که قبلاً در شکل‌های نامحلول و غیرقابل دسترس برای گیاهان بود، به شکل‌های محلول و قابل جذب تبدیل می‌شود (Ebrahimi et al., 2018). با انحلال ترکیبات نامحلول فسفات و آزادسازی یون‌های فسفات و کاتیون‌های همراه، غلظت یون‌ها در محلول خاک افزایش می‌یابد. این افزایش غلظت یونی منجر به افزایش هدایت

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های ریشه جو

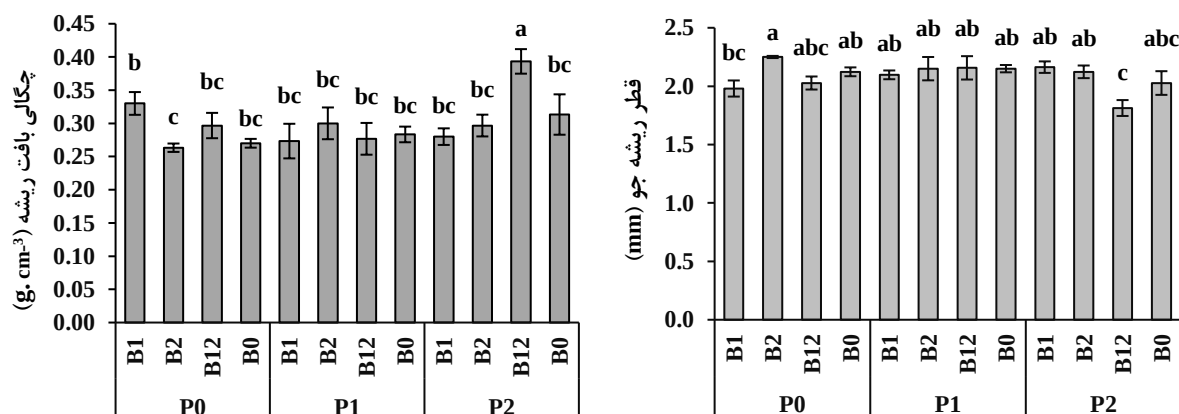
منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر	وزن خشک	حجم	چگالی بافت	رطوبت	طول	سطح	قطر ریشه	تراکم سطح
بلوک	۲	۱/۴۸ ^{ns}	۰/۰۹۷ ^{ns}	۱/۱۳ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۱۹۳۰/۷ ^{ns}	۰/۰۷۷ ^{ns}	۳/۲۲۶ ^{ns}	۰/۰۲۲ ^{ns}	۴/۰۴۷ ^{ns}
باکتری	۳	۰/۶۱ ^{ns}	۰/۰۰۵ ^{ns}	۰/۵۳ ^{ns}	۰/۰۰۲ ^{ns}	۳۸۷۵/۴*	۰/۰۰۴ ^{ns}	۰/۷۹۴ ^{ns}	۰/۰۴۷*	۰/۸۷۳ ^{ns}
فسفر	۲	۱/۲۵ ^{ns}	۰/۰۴۲ ^{ns}	۱/۶۹ ^{ns}	۰/۰۰۵*	۲۵۷۸/۲ ^{ns}	۰/۰۳۴ ^{ns}	۳/۰۷۹ ^{ns}	۰/۰۳۵ ^{ns}	۲/۷۱۳ ^{ns}
باکتری × فسفر	۶	۰/۶۵ ^{ns}	۰/۰۵۳ ^{ns}	۱/۱۱ ^{ns}	۰/۰۰۴*	۲۶۹۶/۳ ^{ns}	۰/۰۴۲ ^{ns}	۲/۳۹۹ ^{ns}	۰/۰۳۶*	۱/۸۰۱ ^{ns}
خطا	۲۲	۰/۷۹	۰/۰۶۷	۰/۸۲	۰/۰۰۱	۱۲۵۹/۹۵	۰/۰۵۳	۲/۴۵۳	۰/۰۱۵	۲/۴۹
ضریب تغییرات (%)		۲۸/۶۴	۲۱/۹۸	۲۲/۵۰	۱۲/۲۶	۱۷/۲۴	۲۱/۹۶	۲۱/۶	۵/۹۶	۲۱/۶۵

* معنی داری در سطح آماری پنج درصد و ^{ns} از لحاظ آماری غیر معنی دار.

ریشه غیر معنادار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر قطر ریشه نشان داد بیشترین قطر ریشه در تیمار باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد که تفاوت معنی داری با تیمار B12 (کنسرسیوم دو باکتری) داشت و کمترین مقدار آن در تیمار B12 (کنسرسیوم دو باکتری) مشاهده شد. میان تیمارهای سویه باکتری *P. agglomerans* و *P. putida* و تیمار شاهد تفاوت معناداری از نظر اثر بر قطر ریشه وجود نداشت (شکل ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر قطر ریشه نشان داد بیشترین میزان قطر ریشه در سطح صفر فسفر و باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد و کمترین میزان قطر ریشه

اثر اصلی باکتری بر چگالی بافت ریشه غیر معنادار، اثر اصلی فسفر و اثر متقابل فسفر × باکتری بر چگالی بافت ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری نشان داد بیشترین میزان چگالی بافت ریشه در تیمار P2B12 (سطح ۱۲ میلی گرم فسفر و کنسرسیوم دو گونه باکتری) مشاهده شد و کمترین میزان چگالی بافت ریشه در تیمار P0B2 (سطح صفر فسفر و باکتری *P. agglomerans*) مشاهده شد (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی باکتری و اثر متقابل باکتری و فسفر بر قطر ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود و اثر اصلی فسفر بر قطر

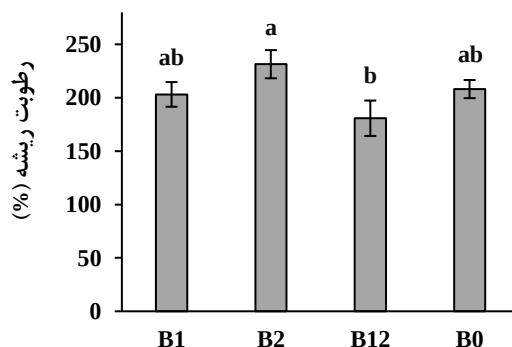
در سطح ۱۲ میلی گرم فسفر و تیمار کنسرسیوم دو باکتری مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر چگالی بافت و قطر ریشه جو. B1، B2، B12 و B0 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13، p5، *P. agglomerans*، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و P0، P1 و P2 بیانگر سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ میلی گرم خاک فسفات در کیلوگرم خاک می‌باشند. حروف مشترک در بالای ستون‌ها بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

میانگین نیز نشان داد که کمترین میزان رطوبت در تیمار کنسرسیوم دو باکتری مشاهده شد که تفاوت آن با شاهد و باکتری *P. putida* غیرمعنادار بود (شکل ۴).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی باکتری بر میزان رطوبت ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. اثر اصلی فسفر و اثر متقابل باکتری و فسفر بر میزان رطوبت ریشه غیر معنادار بود (جدول ۴). نتایج مقایسه



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر رطوبت ریشه جو. B1، B2، B12 و B0 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13، *P. agglomerans*، p5، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و حروف مشترک در بالای ستون‌ها بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد و اجزای

عملکرد جو

در این بخش ۹ ویژگی مورد مطالعه قرار گرفتند که از میان آنها تأثیر تیمارهای آزمایشی بر تعداد دانه، عملکرد زیستی غیرمعنادار بود (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد و اجزای عملکرد جو

میانگین مربعات										درجه آزادی	منابع تغییر
غلظت فسفر در دانه	وزن دانه	وزن سنبله	وزن هزار دانه	شاخص برداشت	عملکرد بیولوژیکی	وزن برگ	ارتفاع بوته	تعداد دانه	وزن کاه و کلش		
۲۱۴۵۷۸ ^{ns}	۰/۰۸۵ ^{ns}	۰/۰۹۸ ^{ns}	۲/۳۰ ^{**}	۲۳*	۰/۰۵۳ ^{ns}	۰/۰۰۲ ^{ns}	۲/۴ ^{ns}	۱۱/۶*	۰/۰۲۰ ^{ns}	۲	بلوک
۲۵۲۲۷۵ ^{**}	۰/۳۰۶ ^{ns}	۰/۳۲۶*	۱/۰۸ ^{**}	۲۳*	۰/۵۶۳ ^{ns}	۰/۰۲۲ ^{ns}	۱۴/۴ ^{**}	۷۹/۶ ^{ns}	۰/۰۴۹ ^{**}	۳	باکتری
۱۵۹۴۱۳ ^{**}	۰/۳۱۳*	۰/۳۱۱ ^{ns}	۲۲/۷۶ ^{**}	۳۷*	۰/۵۵۵ ^{ns}	۰/۰۶۳ ^{ns}	۵/۳ ^{ns}	۵۱/۲ ^{ns}	۰/۰۳۲ ^{ns}	۲	فسفر
۳۲۱۵۹ ^{**}	۰/۰۵۷ ^{ns}	۰/۱۱۵ ^{ns}	۵/۱۷ ^{ns}	۱۷ ^{ns}	۰/۳۵۸ ^{ns}	۰/۰۷۵*	۴/۹ ^{ns}	۳۴/۴ ^{ns}	۰/۰۳۰ ^{ns}	۶	باکتری × فسفر
۷۹۴۵	۰/۰۷۰	۰/۰۹۷	۳/۲۷	۷	۰/۲۳۳	۰/۰۲۴	۲/۱	۳۱/۶	۰/۰۱۵	۲۲	خطا
۱۲/۴۵	۱۱/۰۴	۱۱/۷۴	۴/۵۷	۶/۱۰	۹/۱۰	۱۴/۳۱	۴/۲۶	۹/۳۱	۹/۴۱		ضریب تغییرات (%)

** معنی داری در سطح آماری یک درصد، * معنی داری در سطح آماری پنج درصد و ^{ns} از لحاظ آماری غیر معنی دار.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی باکتری

بر وزن کاه و کلش و ارتفاع بوته در سطح احتمال ۱ درصد و بر وزن سنبله در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. اثر اصلی فسفر و اثر متقابل باکتری و فسفر بر این صفات غیرمعنادار بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری نشان داد که کمترین مقدار وزن کاه و کلش از تیمار کنسرسیوم دو باکتری حاصل شد که با تیمار شاهد (بدون باکتری) تفاوت غیرمعنادار داشت. بیشترین مقدار وزن کاه و کلش در تیمار باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد که تفاوت غیرمعنادار با تیمار باکتری *P. putida* داشت (جدول ۶). مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری

بر ارتفاع جو نشان داد بیشترین ارتفاع بوته در تیمار باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد که تفاوت غیرمعنادار با تیمار باکتری *P. putida* داشت. کمترین مقدار ارتفاع بوته در تیمار شاهد باکتری (B0) مشاهده شد که تفاوت معناداری با تیمار کنسرسیوم دو باکتری نداشت (جدول ۶). مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر وزن سنبله جو نشان داد بیشترین وزن سنبله در تیمار باکتری *P. putida* مشاهده شد که تفاوت معناداری با تیمار باکتری *P. agglomerans* نداشت. کمترین مقدار وزن سنبله در تیمار شاهد (B0) مشاهده شد که تفاوت معناداری با تیمار کنسرسیوم دو باکتری نداشت (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر برخی از صفات جو

تیمار	وزن سنبله (گرم در گلدان)	ارتفاع بوته (cm)	شاخص برداشت (%)	وزن هزار دانه (گرم)	وزن کاه و کلش (گرم در گلدان)
B1	۳/۰۸a	۳۴/۴۹a	۴۶/۶۸a	۴۰/۰۵ab	۱/۳۸a
B2	۳/۰۴a	۳۵/۰۰a	۴۵/۵۹a	۴۰/۸۹a	۱/۳۹a
B12	۲/۸۰ab	۳۳/۹۶ab	۴۵/۲۲a	۳۹/۵۸ab	۱/۲۳b
B0	۲/۶۹b	۳۲/۱۰b	۴۲/۸۷b	۳۷/۷۳b	۱/۲۹ab

B1، B2، B12 و B0 به ترتیب بیانگر *P. agglomerans* p5، *P. putida* p13، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و حروف مشترک در بالای ستون‌ها نیز بیانگر عدم وجود تفاوت معنا دار میان تیمارها می باشد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرهای اصلی فسفر و باکتری بر شاخص برداشت جو در سطح احتمال ۵ درصد و بر وزن هزار دانه در سطح احتمال یک درصد معنادار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین اثر اصلی فسفر نشان داد بیشترین شاخص برداشت در تیمار شاهد فسفر مشاهده شد که اختلاف غیرمعنادار با تیمار ۱۲ میلی گرم فسفر داشت. در حالی که تیمار ۶ میلی گرم فسفر منجر به حصول کمترین شاخص برداشت گردید. مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری نشان داد بین تیمارهای باکتری تفاوت غیرمعناداری از نظر شاخص برداشت وجود نداشت. میزان شاخص شاخص برداشت در تیمار شاهد به طور معناداری از تیمارهای حاوی باکتری کمتر بود (جدول ۷). مقایسه میانگین اثر اصلی فسفر نشان داد بیشترین وزن هزار دانه در تیمار ۱۲ میلی گرم فسفر مشاهده شد که اختلاف غیرمعنادار با تیمار شاهد فسفر داشت. در حالی که تیمار ۶ میلی گرم فسفر منجر به حصول کمترین وزن هزار دانه گردید (جدول

۷). مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری نشان داد بین تیمارهای باکتری تفاوت معناداری از نظر شاخص برداشت وجود نداشت. میزان وزن هزار دانه در تیمار شاهد به طور معناداری از تیمارهای حاوی باکتری (تیمار *P. agglomerans* و تیمار *P. putida*) کمتر بود (جدول ۷). نتایج تجزیه واریانس نشان داد، اثر اصلی فسفر بر وزن دانه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. اثر اصلی باکتری و اثر متقابل باکتری و فسفر بر وزن دانه جو غیرمعنادار بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین اثر اصلی فسفر بر وزن دانه جو نشان داد تفاوت بین تیمار شاهد و ۱۲ میلی گرم فسفر از نظر اثر بر وزن دانه، غیرمعنادار بود و تیمار ۱۲ میلی گرم فسفر دارای بیشترین وزن دانه بود. کمترین وزن دانه در تیمار ۶ میلی گرم فسفر مشاهده شد که تفاوت معنادار با سطوح شاهد و ۱۲ میلی گرم فسفر داشت (جدول ۷).

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر اصلی فسفر بر شاخص برداشت جو

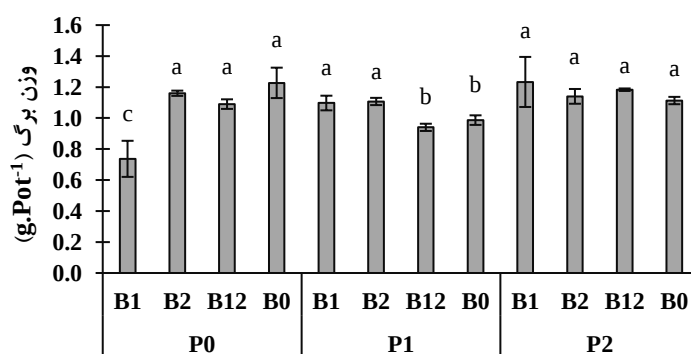
تیمار	وزن دانه در گلدان (گرم)	شاخص برداشت (%)	وزن هزار دانه (گرم)
P0	۲/۱۴a	۴۶/۸۷a	۴۰/۰۵ab
P1	۲/۲۱b	۴۳/۳۸b	۳۸/۰۱b
P2	۲/۵۰a	۴۵/۰۳ab	۴۰/۶۳a

P0، P1 و P2 بیانگر سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ میلی گرم در کیلوگرم خاک فسفات در خاک می‌باشند. حروف مشترک در هر ستون نیز بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

وزن برگ

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی باکتری و اثر اصلی فسفر بر وزن برگ جو غیر معنادار بود. اثر متقابل باکتری و فسفر بر وزن برگ جو در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین اثر متقابل

فسفر و باکتری بر وزن برگ نشان داد بیشترین میزان وزن برگ در سطح صفر فسفر و باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد و کمترین میزان سطح برگ در سطح ۱۲ میلی گرم فسفر و تیمار کنسرسیوم دو باکتری مشاهده شد (شکل ۵).

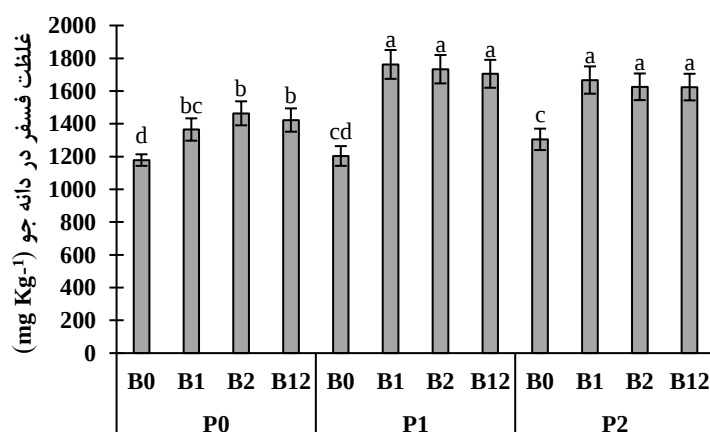


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر وزن برگ جو. B0 و B12، B2، B1 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13، *P. agglomerans* p5، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و P0، P1 و P2 بیانگر سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ میلی گرم خاک فسفات در کیلوگرم خاک می‌باشند. حروف مشترک در بالای ستون‌ها نیز بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

بطور متوسط در سطح صفر فسفر باعث افزایش ۲۰ درصدی فسفر دانه، در سطح P1 باعث افزایش ۴۴ درصدی و در سطح P2 باعث افزایش ۲۵ درصدی میزان فسفر دانه در مقایسه با تیمار بدون باکتری در هر سطح فسفر شدند. بیشترین میزان فسفر در سطح ۱ و ۲ فسفر مشاهده گردید. کمترین میزان فسفر دانه در تیمار بدون کاربرد خاک فسفات و بدون مایه‌زنی باکتری مشاهده گردید (شکل ۶).

غلظت فسفر در دانه جو

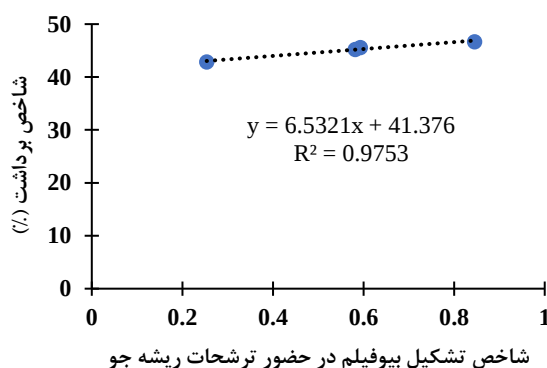
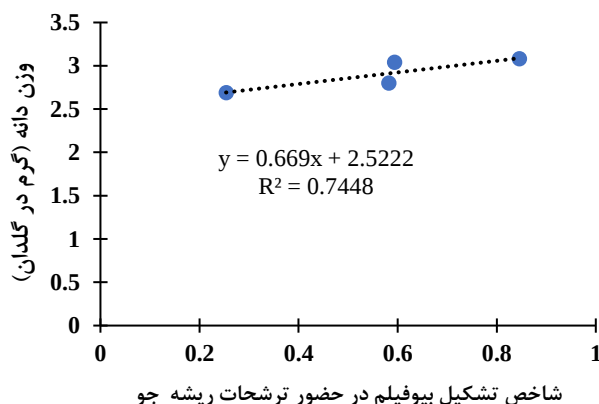
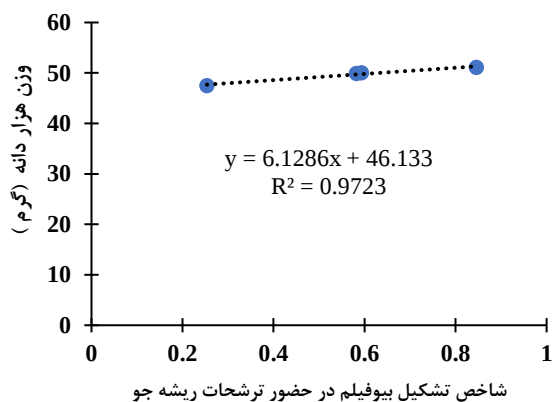
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی باکتری و فسفر و اثرات متقابل آنها بر میانگین غلظت فسفر در دانه جو در بین تیمارها در سطح احتمال یک درصد معنادار بود (جدول ۵). در تمامی سطوح فسفر بیشترین میزان غلظت فسفر در اثر تلقیح باکتری‌ها مشاهده گردید که در داخل هر سطح اختلاف معناداری باهم نداشتند و



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر مقدار فسفر دانه جو. B0 و B12، B2، B1 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13، *P. agglomerans* p5، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و P0، P1 و P2 بیانگر سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ میلی گرم خاک فسفات در کیلوگرم خاک می‌باشند. حروف مشترک در بالای ستون‌ها نیز بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

ارتباط میان قدرت تشکیل بیوفیلم توسط اجزای زیستی کود فسفات بارور ۲ و عملکرد جو

برقراری ارتباط رگرسیونی میان صفات وزن دانه در گلدان، وزن هزار دانه و شاخص برداشت با شاخص



شکل ۷- رابطه رگرسیونی بین شاخص تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ و صفات وزن هزار دانه، وزن دانه در بوته و شاخص برداشت در جو. مدل رگرسیونی در سطح احتمال ۵٪ معنادار است.

و موجب رهایش فسفر از آن می‌شوند. این محققان همچنین بر مبنای مطالعات با میکروسکوپ الکترونی گزارش کردند که میزان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های یاد شده با میزان کمبود فسفر رابطه مستقیم داشته و در شرایط کمبود فسفر قابل دسترس، میزان تشکیل بیوفیلم زیاده‌تر است. بنابراین به‌نظر می‌رسد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات، انواع مکانیسم‌های درگیر در رهاسازی فسفر از منابع نامحلول را به‌طور کارآمدتری نسبت به شرایط آزادزی فعال می‌نماید (Valetti et al., 2018).

شدت وقوع تنش‌های غیرزیستی و زیستی در خاک‌های زراعی بالا می‌باشد، بنابراین زندگی به شکل بیوفیلم و بهره‌برداری از مزایای آن می‌تواند میکروب‌های خاک را در برابر این شرایط نامساعد حفاظت نماید. کمبود مواد غذایی یکی از مهم‌ترین عوامل محرک تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های خاک‌زی به شمار می‌رود (Costerton et al., 1999). یافته‌های Ghosh و همکاران (2019) در خاک‌های دچار فقر فسفر قابل جذب، نشان داد که باکتری‌های *Burkholderia tropica* P4 و *B. unamae* P9 بر روی ذرات خاک فسفات و سنگریزه‌های آن بیوفیلم تشکیل داده

وجود فسفر برای رشد محصولات کشاورزی حیاتی است و در تمام مراحل رشد محصول نقش دارد. چندین فرآیند کلیدی گیاهی، از جمله بیوسنتز اجزای اصلی سلولی (مانند اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدهای غشایی، ATP و غیره) به این عنصر بستگی دارند، بنابراین، تولید غذای جهانی به طور جدایی‌ناپذیری به کودهای فسفر وابسته است (Bindraban et al., 2020). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از خاک فسفات توانست میزان تولید دانه جو در گلدان را افزایش دهد (جدول ۷). این نتیجه اولاً با عنایت به نقش حیاتی فسفر در تولید ماده خشک دور از انتظار نیست. ثانیا نشان می‌دهد که احتمالاً یا گیاه جو به واسطه ترشح برخی از اسیدهای آلی توانسته است از خاک فسفاتی که به شکل پودری به خاک افزوده شده بود، بهره‌برداری نماید یا از آنجایی که این مطالعه در بستر خاکی غیراستریل انجام شد، میکروب‌های بومی خاک توانسته‌اند در بهره‌برداری از این منبع فسفات نقش داشته باشند.

در خاک‌های کشاورزی فقیر از فسفر قابل جذب، میکروارگانیسم‌های عرضه‌کننده فسفر، اعم از باکتری‌ها یا قارچ‌ها از طریق انحلال، تحرک یا معدنی‌سازی، به طور قابل توجهی بر سه پدیده دینامیکی چرخه فسفر جذب-واجذب، انحلال-رسوب و کانی‌سازی-تحرک تأثیر می‌گذارند (Sharma et al, 2013). با عنایت به اینکه این آزمایش در خاکی با میزان فسفر قابل جذب حدود ۶ میلی-گرم بر کیلوگرم خاک (خاک نسبتاً فقیر از نظر فسفر) انجام شد و از آنجایی که باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ توانستند برخی از ویژگی‌های رشدی در جو را متاثر سازند، لذا به نظر می‌رسد در این خصوص بر دینامیک فسفر در خاک موثر بوده باشند. این احتمال با توجه به میزان فسفر دانه جو (شکل ۶) در تیمارهای مختلف تقویت می‌شود و نشان دهنده پاسخ به تیمارهای میکروبی در این گونه خاک‌ها می‌باشد. وجود رابطه رگرسیونی معنی‌دار بین شاخص‌ها عملکردی مانند وزن هزار دانه، وزن دانه و شاخص برداشت (شکل ۹) و شاخص تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های کود زیستی احتمالاً بیانگر تشکیل

بیوفیلم در ریزوسفر جو و نقش آن در تغییرات مفید بین تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌ها در مقایسه با تیمار شاهد می‌باشد.

باکتری‌های حل‌کننده فسفات با افزایش میزان فسفر قابل دسترس و همچنین توسعه رشد ریشه گیاه و یا ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی می‌توانند شرایط مساعدتری را در جذب فسفر از خاک فراهم کنند (Hussain et al., 2019). به عبارت دیگر، تلقیح باکتری‌های حل‌کننده فسفر در گیاهان علاوه بر اینکه می‌تواند بیان ژن ناقل Pi را در ریشه‌ها تنظیم کند، می‌تواند تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده فسفر (جهت استفاده از منابع آلی و معدنی) و فیتوهورمون‌های موثر در تغییرات ریخت‌شناسی ریشه را که در جذب فسفر موثر هستند را تحریک کند (Batool and Iqbal, 2019). ایندول ۳- استیک اسید از جمله هورمون‌هایی است که تولید آن منشأ میکروبی در ریزوسفر داشته و ارتباط میان تولید آن و حضور باکتری‌های حل‌کننده فسفات جهت ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی ریشه برای جذب بهتر فسفر گزارش شده است (Emami et al., 2019). باکتری‌های سودوموناس قادر به تولید هورمون‌های اکسین، جیبرلین و ویتامین‌ها است و نقش احتمالی آنها در افزایش عملکرد ماده خشک را نمی‌توان نادیده گرفت (Sarikhani and Amini, 2020). بنابراین نظر به بروز برخی تغییرات ریخت‌شناسی ناشی از تلقیح باکتری‌های جداسازی شده از کود زیستی فسفات بارور ۲ به نظر می‌رسد که این تغییرات می‌تواند از هورمون‌هایی مانند ایندول استیک نیز ایجاد شده باشد (Khosravi, 2023).

نتیجه‌گیری

باکتری‌های موجود در کود زیستی فسفات بارور ۲ توانستند در حضور ترشحات ریشه جو بیوفیلم تشکیل دهند. توان تشکیل بیوفیلم در بین باکتری‌ها متفاوت بود و در باکتری *P. agglomerans* بیشترین میزان را نشان داد. همچنین اختلاط دو باکتری توانست بر قدرت تشکیل بیوفیلم اثر گذار باشد. این موضوع با توجه به اینکه بین

شاخص تشکیل بیوفیلم و شاخص‌های عملکردی مهم در جو مانند شاخص برداشت، وزن هزار دانه و وزن دانه ارتباط خطی و مستقیم داشت، بایستی در تهیه مایه تلقیح-های تجاری بویژه در مایه‌تلقیح‌های چند گونه‌ای مورد توجه قرار بگیرد. به این مفهوم که احتمالاً انتخاب باکتری-هایی با توان تشکیل بیوفیلم قوی‌تر و همچنین در صورت استفاده ترکیبی از آنها در تهیه مایه تلقیح ضرورت توجه به هم افزایی در تشکیل بیوفیلم‌های قوی تر کارایی آنها را

افزایش خواهد داد. این موضوع می‌تواند در تهیه سایر کودهای زیستی بسیار مهم باشد.

سپاسگزاری

به این وسیله از مدیریت پژوهشی دانشگاه مراغه و آزمایشگاه‌های بیولوژی و حاصلخیزی خاک گروه علوم و مهندسی خاک آن دانشگاه جهت حمایت‌های مالی و فنی تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Akhvan, S., Sha'banpour, M., & Esfahani, M. (2012). The effect of soil density and texture on root and shoot growth of wheat. *Water and Soil*, 26(3), 727-735. (In Persian)
2. Ali-Ehiayi M and Behbahani AA, 1993. Description of soil chemical analysis methods. Soil and Water Research Institute. No: 892 Iran. (In Persian)
3. Alizadeh, A. (1999). The relationship of water, soil, and plant. Astan Quds Razavi Publishing, Imam Reza University. 353 pages. (In Persian)
4. Asadi, H., & Gorji, M. (2022). Challenges and limitations of soil and land resources in Iran. *Land Management Journal*, 10(1), 111-134. (In Persian)
5. Batool, S., & Iqbal, A. (2019). Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), 1400-1410.
6. Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), E1621-E1630.
7. Bindran, P. S., Dimkpa, C. O., & Pandey, R. (2020). Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health. *Biology and Fertility of Soils*, 56(3), 299-317.
8. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
9. de Oliveira, R. S., Gonçalves, A. R., Ajulo, A. A., Oliveira, L. R., Lanna, A. C., & de Filippi, M. C. C. (2024). Survey and genomic characterization of *Serratia marcescens* on endophytism, biofilm, and phosphorus solubilization in rice plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-15.
10. Ebrahimi, M., Safari-sinegani, A. A., Sarikhani, M., & Aliasgharzad, N. (2018). Study on phosphate solubilizing ability of some bacterial isolates and determination of solubilized phosphorus fractionation in supernatant and microbial biomass. *Journal of Microbial Biology*, 7(25), 109-125. (In Persian)
11. Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Sarmadian, F., & Motessharezadeh, B. (2019). Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 19804-19813.
12. Fallah Nosratabad, A. and Khoshru, B. (2024). Potentials and challenges of biofertilizers in sustainable agriculture. *Journal of Sol Biology*, 12(1), 19-63.
13. Fallah, A. R. (2022). Solubilization Mechanisms of insoluble phosphates by phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of Sol Biology*, 10(1), 93-110.
14. Ghosh, R., Barman, S., & Mandal, N. C. (2019). Phosphate deficiency induced biofilm formation of *Burkholderia* on insoluble phosphate granules plays a pivotal role for maximum release of soluble phosphate. *Scientific Reports*, 9(1), 5477.
15. Habibi, M. , Rejali, F. , Zaefarian, F. and Bagheri, N. A. (2022). Evaluation of root colonization and biochemical compounds of saffron under irrigation regime, arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer. *Journal of Sol Biology*, 10(1), 65-80.
16. Hussain, A., Adnan, M., Iqbal, S., Fahad, S., Saeed, M., Mian, I. A., ... & Andaleeb, S. (2019). 78. Combining phosphorus (P) with phosphate solubilizing bacteria (PSB) improved wheat yield and P uptake in alkaline soil. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 8(2), 1809-1817.
17. Joshi, R. V., Gunawan, C., & Mann, R. (2021). We are one: multispecies metabolism of a biofilm consortium and their treatment strategies. *Frontiers in Microbiology*, 12, 635432.
18. Karimi, E., Aliasgharzad, N., & Esfandyari, E. (2023). Evaluation of biofilm formation ability by biofilm growth promoting bacteria at the root

- surface of wheat (*Triticum aestivum* L.) and their effects on grain yield. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 33(2):133-146. (In Persian)
19. Karimi, E., Aliasgharzad, N., Esfandiari, E., Hassanpouraghdam, M. B., Neu, T. R., Buscot, F., ... & Tarkka, M. T. (2022). Biofilm forming rhizobacteria affect the physiological and biochemical responses of wheat to drought. *AMB Express*, 12(1), 93.
20. Karimi, E., Alisgharzad, N., Mousavi, S. B., & Aliloo, A. (2022). The effect of growth promoting bacteria on barley yield and morphological root characteristics under different water conditions. *Journal of Soil and Plant Interactions*, 13(2): 67-81. (In Persian)
21. Karimi, E., Mohammadi, S. & Esfandyari, E. (2022). Effect of biofilm-forming plant growth promoting bacterium and tryptophan on yield and Cadmium uptake in Rye (*Secale cereale*). *Journal of Soil Biology*, 10(2), 177-191. (In Persian)
22. Kasim, W. A., Gaafar, R. M., Abou-Ali, R. M., Omar, M. N., & Hewait, H. M. (2016). Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Sciences*, 61, 217–227.
23. Khosravi, H. (2023). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Inoculation on Wheat Growth Indices in Saline Irrigation Conditions. *Journal of Sol Biology*, 11(1), 17-31.
24. Leytem, A. B., & Westermann, D. T. (2003). Phosphate sorption by Pacific Northwest calcareous soils. *Soil science*, 168(5), 368-375.
25. Mishra, B. K., & Barolia, S. K. (2020). Quality assessment of microbial inoculants as biofertilizer. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(10), 3715-3729.
26. Naseri, R., Barary, M., Zarea, M. J., Khavazi, K., & Tahmasebi, Z. (2019). Wheat-root system influenced by application of phosphate solubilizing bacteria and mycorrhizal fungi under different levels of phosphorous chemical fertilizer. *Journal of Soil Biology*, 6(2), 137-155. (In Persian)
27. Ochoa-Loza FJ, Artiola JF, Maier RM (2001) Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *J Environ Qual* 30:479–485.
28. Rehman, F. U., Kalsoom, M., Adnan, M., Toor, M., & Zulfiqar, A. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria and their mechanisms involved in agricultural crop production: a review. *SunText Rev. Biotechnol*, 1(2), 1-6.
29. Rejali, F., Asadirahmani, H., Khavazi, K., Asgharzadeh, A., & Esmaeilizad, A. (2014). The place of phosphatic biofertilizers and necessity to develop them in Iranian agriculture. *Land Management Journal*, 2(1), 27-39. (In Persian)
30. Sarikhani, M. R., & Amini, R. (2020). Biofertilizer in sustainable agriculture: review on the researches of biofertilizers in Iran. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 30(1), 329-365. (In Persian)
31. Seneviratne, G., Jayasinghearachchi, H.S., 2005. A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1975–1978.
32. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14.
33. Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.
34. Taktek, S., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J. A., & Antoun, H. (2017). Igneous phosphate rock solubilization by biofilm-forming mycorrhizobacteria and hyphobacteria associated with *Rhizoglossus irregulare* DAOM 197198. *Mycorrhiza*, 27, 13-22.
35. Tohidinia, M. A., Mazaheri, D., Bagher-Hosseini, S. M., & Madani, H. (2013). Effect of biofertilizer Barvar-2

- and chemical phosphorus fertilizer application on kernel yield and yield components of maize (*Zea Mays* Cv. Sc704). *Iranian Journal of Crop Science*, 4(60): 295-307. (In Persian)
36. Valetti, L., Iriarte, L., & Fabra, A. (2018). Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Applied Soil Ecology*, 132, 1-10.
37. Van Kauwenbergh, S. J. (2010). World phosphate rock reserves and resources (p. 48). Muscle Shoals: Ifdc.
38. Wang, D., Jiang, C., Zhang, L., Chen, L., & Zhang, X. (2019). Biofilms positively contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54 induced drought tolerance in tomato plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 6271.