

ارزیابی ویژگی‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه در کودهای زیستی از توبارور، پتابارور، رویین و فسکو

بهمن خوشرو* و محمدرضا ساریخانی^۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۳۰

۱- دانشجوی دکتری علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bahmankhoshru@yahoo.com

چکیده

در این پژوهش سه نمونه کود زیستی تولید داخل کشور شامل ازتوبارور (Azotobarvar)، پتابارور (Potabarvar) و رویین (Ruein) و یک نمونه کود هندی به نام فسکو (Phosco) از لحاظ تعداد جمعیت میکروبی و ویژگی‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج شمارش جمعیت میکروبی نشان داد که کود پتابارور فاقد جمعیت زنده باکتریایی است، اما تعداد سلول زنده در هر گرم (CFU g^{-1}) ازتوبارور، رویین و فسکو به ترتیب $۱۰^8 \times ۳/۵$ ، $۱۰^8 \times ۵/۲$ و $۱۰^۳ \times ۶/۹$ به دست آمد. از کود ازتوبارور دو جدایه (Az1 و Az2)، از کود رویین سه جدایه (R1، R2 و R3) و از کود فسکو سه جدایه (P1، P2 و P3) جداسازی شدند. نتایج اندازه‌گیری ویژگی‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای نشان داد که از نظر ویژگی تثبیت نیتروژن مولکولی در محیط جامد و مایع LG دو جدایه R1 و Az2، در انحلال فسفات معدنی از منبع تری‌کلسیم فسفات دو جدایه Az1 و Az2، در آزادسازی پتاسیم دو جدایه P1 و Az1 از بیوتیت و دو جدایه P2 و Az1 از موسکویت و در تولید اکسین نیز جدایه P1 در حضور تریپتوفان بیشترین عملکرد را داشتند. جدایه‌های P1، P3، R1 و R3 دارای فعالیت ضد قارچی علیه قارچ فوزاریوم سولانی بودند. جمع‌بندی نتایج شمارش جمعیت میکروبی و نیز ویژگی‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه نشان داد که کود زیستی رویین و ازتوبارور دارای وضعیت مطلوبی بوده و کود فسکو علی‌رغم داشتن برخی ویژگی‌های محرک رشد، فاقد جمعیت کافی بوده و کود پتابارور نیز فاقد جمعیت میکروبی بود.

واژه‌های کلیدی: آزادکنندگی پتاسیم و تولید اکسین، تثبیت نیتروژن مولکولی، حل‌کننده فسفات و کود زیستی

Evaluation of Plant Growth Promoting Characteristics in Commercial Biofertilizers of Azotobarvar, Potabarvar, Ruein and Phosco

B Khoshru^{1*} and MR Sarikhani²

Received: November 14, 2018 Accepted: May 19, 2020

¹ PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

² Assoc. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Univ. of Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: bahmankhoshru@yahoo.com

Abstract

In this study, three domestic biofertilizer samples including Azotobarvar, Potabarvar, Ruein, and a sample of Indian biofertilizer called Phosco were studied in terms of microbial population count and plant growth promoting characteristics. The results of plate counting revealed that Potabarvar had no alive bacterial population, but the number of viable cells of Azotobarvar, Ruein and Phosco were 3.5×10^8 , 5.2×10^8 and 6.9×10^3 CFU g⁻¹, respectively. Moreover, two isolates (Az1 and Az2), three isolates (R1, R2 and R3) and three isolates (P1, P2 and P3) were isolated in Azotobarvar, Ruein and Phosco, respectively. The in-vitro results of plant growth promoting characteristics showed that in the solid LG medium R1 and Az2 and in the liquid LG medium, P1, R1 and Az2 and had the highest nitrogen fixation, respectively. In phosphate solubilizing from tricalcium phosphate, Az1 and Az2, in potassium releasing ability, Az1 and P1 isolates from biotite and Az1 and P2 from muscovite and in production of auxin P1 in the presence of tryptophan had the highest performance, respectively. The isolates P1, P3, R1 and R3 had antifungal activity against *Fusarium solani*. Summarizing the results of microbial population counts as well as plant growth promoting characteristics showed that the both Ruein and Azotobarvar biofertilizers were in desirable condition and Phosco biofertilizer, despite having some growth-promoting properties, lacked a sufficient microbial population and the Potabarvar biofertilizer lacked the microbial population.

Keywords: Auxin production, Biofertilizer, Molecular nitrogen fixation, Phosphate solubilization, Release of potassium

مقدمه

عبارتند از: تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفات‌های نامحلول، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد، سایدر فور و آنزیم ACC-دآمیناز، حذف رقابتی پاتوژن‌ها یا حذف سوبستراهای فیتوتوکسیک تولیدشده به وسیله باکتری‌های آسیب‌رسان و ریشه‌های گیاه در شرایط تنش (باشان و دباشان ۲۰۱۰، ساریخانی و همکاران ۲۰۱۹ و ۲۰۱۶). شناسایی پتانسیل میکروبی در خاک و به‌کارگیری آن در قالب کودهای زیستی در کشورهای مختلف به چشم می‌خورد. امروزه در نقاط مختلف دنیا شاهد شناسایی و به‌کارگیری این گروه از باکتری‌ها در

کود زیستی یا بیولوژیک اصطلاحاً به مواد حاوی ریزجاندارانی اطلاق می‌شود که وقتی بر روی بذر، سطح ریشه و یا در خاک قرار گیرد، موجب تحریک و افزایش رشد گیاه می‌شود (وسی ۲۰۰۳). اصطلاح باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه یا PGPR^۱ اشاره به باکتری‌های خاک دارند که در ریزوسفر گیاه به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (تیومرانگ و همکاران ۲۰۱۰). برخی از مکانیسم‌های مستقیم و غیر مستقیم باکتری‌های PGPR

¹ Plant growth-promoting rhizobacteria

قالب کودهای زیستی مختلف هستیم (ساریخانی

۲۰۱۶).

هدف اصلی از توسعه فناوری زیستی در خصوص باکتری‌های محرک رشد گیاه، افزایش جمعیت باکتری‌های مؤثر در خاک است که می‌تواند به توسعه کشاورزی پایدار کمک کند و نیاز به استفاده از کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها را کاهش دهد (آدسمویه و کلوپر ۲۰۰۹). به دلیل هدفی که کشاورزی پایدار دنبال می‌کند به میکروارگانیسم‌های کارآمد و مفید خاک توجه ویژه‌ای می‌شود (خوشمنظر و همکاران ۲۰۱۹، حیدرپور و همکاران ۲۰۱۹، ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸) و مهم‌ترین مسأله در استفاده حداکثر از مزایای این فناوری، انتخاب سویه موثر PGPR می‌باشد (خوشرو و همکاران ۲۰۱۹a، b و c). بخاطر نتایج امیدوارکننده کاربرد کودهای زیستی، درحال حاضر واحدهای متعددی از بخش‌های دولتی و خصوصی به تولید کودهای زیستی روی آورده‌اند. خوشبختانه دانش‌کشاورزان در خصوص مزایای استفاده از این‌گونه کودها نیز رو به گسترش است. با این وجود باید به خاطر داشت که تداوم استقبال کشاورزان از کودهای مذکور بستگی به کیفیت آن‌ها دارد (ساریخانی ۲۰۱۶، خوشرو و همکاران ۲۰۱۵ a و b). اطمینان از اثر بخشی هر محصول اولین حق هر مصرف‌کننده‌ای است که باید از طریق سازمانها و یا وزارتخانه‌های ذیربط تأیید گردد. کودهای زیستی نیز از این امر مستثنی نبوده و کیفیت اینگونه کودها، اولین موردی است که باید از سوی مراجع ذیربط تأیید گردد. با وجود زیاد بود تولیدات کودهای زیستی، ارزیابی آن‌ها به لحاظ کیفی کمتر انجام شده است. به عنوان نمونه در کشور هندوستان شروع این کار به سال ۱۹۷۲ برمی‌گردد (حسین و همکاران ۲۰۰۷). در ایران نیز به منظور ساماندهی مواد کودی و ارتقاء کیفیت آنها، با استفاده از ظرفیت‌های قانونی موجود "آیین نامه ثبت و کنترل کیفی انواع مواد کودی" تنظیم و موسسه تحقیقات خاک

و آب متولی انجام این امر قرار داده شد. بهره‌گیری از کودهای زیستی در کشاورزی و مشاهده اثرات مثبت آن‌ها منوط به رعایت جنبه‌های کیفی این کودها، استفاده از سویه‌های مؤثر با توجه به ویژگی PGPR آنها و همچنین نحوه صحیح بکارگیری آنها در مزرعه است (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶، خوشرو و همکاران a ۲۰۱۵). برای تأیید حضور گونه‌های کارا و همچنین حضور جمعیت فعال میکروبی در مدت زمان اعتبار کود زیستی، انجام کنترل کیفیت لازم می‌باشد (خوشرو و همکاران b ۲۰۱۵). ارزیابی کودهای زیستی شامل سنجش کیفیت و توان کودهای زیستی به لحاظ برخی ویژگی‌ها از قبیل تعداد جمعیت میکروبی، توانایی تثبیت نیتروژن، توان انحلال فسفات نامحلول، توان تولید اکسین، قدرت رهاسازی پتاسیم و همچنین تشخیص عدم وجود آلودگی و تایید گونه‌های میکروبی بکار رفته در کود زیستی با استفاده از تکنیک‌های خاص می‌باشد (موتسارا و روی ۲۰۰۸، خوشرو و همکاران a ۲۰۱۷). در مطالعه‌ای که بین سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ روی کودهای زیستی رایج در کشور اندونزی انجام گرفت، ۴۱ کود زیستی توسط حسین و همکاران (۲۰۰۷) مورد سنجش قرار گرفتند. در اغلب این کودها از دو یا تعداد بیشتری ریزجاندار استفاده شده بود. نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های حل‌کنندگی فسفات و تولید اکسین توسط این کودها حاکی از این بود که تنها یک نوع کود زیستی قادر به سنتز اکسین توسط باکتری *Azospirillum lipoferum* در محیط نمک‌های معدنی حداقل (حاوی ال-تریپتوفان) بود. در پژوهش دیگری ساریخانی و انصاری (۲۰۱۵) اقدام به ارزیابی چهار نوع کود زیستی رایج در ایران (بارور۲، نیتروکسین، بیوسوپرفسفات و سوپرنیتروپلاس) نمودند. بررسی ویژگی‌های محرک رشدی گیاه این کودها نشان داد که از نظر ویژگی حل‌کنندگی فسفات، بارور۲ و بیوسوپرفسفات و در تولید اکسین نیز نیتروکسین و بارور۲ عملکرد خوبی داشتند و هیچ کدام از این کودها

توسط سویه‌های جدا شده از کودهای زیستی از توبارور، پتابارور، رویین (تولید داخل) و فسکو (تولید هند) پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

کودهای زیستی مورد مطالعه

این پژوهش در ۱۳۹۶ در آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز انجام گرفت. در این پژوهش چهار کود زیستی شامل از توبارور، پتابارور، رویین (تولید شرکت زیست فناور سبز) و فسکو (تولید کشور هند) مورد بررسی قرار گرفتند. ویژگیها و مشخصات تولیدی این کودها در جدول ۱ ارائه شده است. در زمان آزمایش، تاریخ مصرف آنها هنوز به اتمام نرسیده بود.

جدول ۱- اطلاعات قید شده از طرف تولیدکنندگان کودهای زیستی مورد آزمایش در این تحقیق.

کود زیستی	جنس و گونه باکتری	برخی ویژگی‌ها	تاریخ اعتبار
از توبارور	<i>Azotobacter vinelandii</i>	تثبیت نیتروژن و تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، 10^8 CFU g^{-1}	۹۵/۷/۲۸-۹۶/۴/۲۸ (O41B)
پتابارور	<i>Pseudomonas koreensis</i> <i>Pseudomonas vancouverensis</i>	آزادکنندگی پتاسیم، حل کنندگی فسفر، 10^8 CFU g^{-1}	۹۵/۹/۱۶-۹۶/۴/۱۶ (سری تولید O21A)
رویین	<i>Bacillus subtilis</i> BS106 <i>Bacillus subtilis</i> BS24	قارچ‌کش - ضد پاتوژن، 10^8 CFU g^{-1}	۹۵/۸/۱۹-۹۶/۲/۱۹ (سری تولید O8B)
Phosco	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>B. subtilis</i> <i>Azospirillum</i> sp.	حاوی باکتری‌های حل‌کننده فسفر، 10^7 CFU g^{-1}	2016-2017

تهیه شد و از چهار رقت پایانی (رقت 10^{-7} ، 10^{-8} ، 10^{-9} و 10^{-6}) در ۲ تکرار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط جامد عمومی و اختصاصی انتقال داده شد، برای این منظور از محیط کشت عمومی LB^۲ و دو محیط کشت نیمه-انتخابی Sperber و LG استفاده شد که به ترتیب برای رشد عموم باکتری‌ها، باکتری‌های حل‌کننده فسفات و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن از نوع *Azotobacter* و *Azospirillum* قابل استفاده می‌باشد

ویژگی آزادکنندگی پتاسیم نداشتند. شناسایی سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این چهار کود زیستی حاکی از آن بود که در مجموع ۱۳ جدایه از این چهار کود بدست آمد و جدایه‌ها متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Citrobacter*، *Acinetobacter*، *Pseudomonas*، *Pantoea* بودند (خوشرو و همکاران b ۲۰۱۵). با توجه به گفته‌های فوق یکی از جنبه‌های مهم در ارزیابی کودهای زیستی، تعداد جمعیت میکروبی بکارگیری شده در کود و ویژگی افزایشی رشد گیاه در آنها اعم از تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات، تولید اکسین و غیره می‌باشد. لذا در پژوهش حاضر، به ارزیابی برخی از جنبه‌های کیفیت کودهای زیستی از قبیل شمارش جمعیت میکروبی، شناسایی جنس و گونه میکروبی مورد استفاده در کودها، ویژگی‌های افزایشی رشد گیاه

شمارش جمعیت میکروبی و جداسازی باکتری‌های موجود در کود زیستی

با توجه به اینکه تعداد جمعیت میکروبی فعال و زنده در کودهای زیستی باید منطبق بر استانداردهای حاکم بر محصولات زیستی باشد، بدین منظور برآورد و شمارش میکروبی به عنوان یکی از پارامترهای کنترل کیفی کودهای زیستی مورد بررسی قرار گرفت. برای مشخص نمودن جمعیت میکروبی، ابتدا سری‌های رقت

² Luria and Bertani

نوبت ۳، ۵، ۷ و ۱۲ روز پس از تلقیح از انکوباتور خارج شده و قطر کلنی رشد یافته (CD^4) و نیز قطر هاله شفاف (شامل قطر کلنی و بخش شفاف اطراف آن) حاصل از انحلال فسفات (HD^5) به دقت اندازه‌گیری شد، متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) در هر نوبت برای هر جدایه محاسبه گردید (خوشرو و ساریخانی ۲۰۱۸). در حالت کمی، هر جدایه باکتری با سه تکرار در محیط کشت اسپربر مایع کشت شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع افزوده شد. ارلن‌های حاوی محیط مایع تلقیح شده و نمونه شاهد بدون باکتری در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند. از سوسپانسیون‌های حاصل مقدار ۲ میلی‌لیتر برداشته و پس از ۵ بار رقیق‌سازی با آب مقطر در دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله سلول‌ها، ذرات باکتری و فسفات نامحلول از سوسپانسیون جمع‌آوری و مقدار فسفر محلول در مایع صاف رویی به روش وانادات-مولیبدات اندازه‌گیری شد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶).

میزان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا

برای انجام این آزمون در محیط مایع، ابتدا کشت شبانه باکتری‌ها در محیط NB انجام پذیرفت و به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از این کشت برای تلقیح در ۲۵ میلی‌لیتر محیط الکساندروف مایع حاوی کانی میکای سفید (موسکویت) یا سیاه (بیوتیت) استفاده شد. برای نمونه شاهد بدون باکتری نیز ۵۰۰ میکرولیتر محیط NB استریل افزوده شد. پس از تلقیح میکروبی تحت شرایط فوق‌الذکر، انکوباسیون به مدت ۱ هفته در دمای ۲۶ درجه سلسیوس با شرایط شیک ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون اجزای محیط در شرایط سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه،

(موتسارا و روی ۲۰۰۸). بعد از گسترده نمودن سوسپانسیون میکروبی از رقت‌های مورد نظر در محیط کشت‌های فوق، شمارش تعداد کلنی باکتری‌ها صورت پذیرفت، و براساس فنوتیپ و ریخت کلنی باکتری‌ها اقدام به جداسازی باکتری‌ها شد تا تست‌های تاییدی مبنی بر وجود ایزوله‌های مورد انتظار بر روی آن‌ها انجام گیرد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶).

اندازه‌گیری ویژگی‌های PGP جدایه‌های موجود در کودهای زیستی

اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن

برای اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن باکتری‌ها از محیط LG جامد و مایع (جدول ۲) استفاده شد. در محیط جامد LG، کشت چمنی^۲ انجام شد تا رشد میکروبی در کل سطح پلیت ۸ سانتی‌متری ظاهر شود. بعد از گذشت ۷ روز از کشت جدایه‌ها، از محیط کشت حاوی رشد میکروبی برای ادامه آزمایش و عمل هضم استفاده شد. لازم به ذکر است که محیط جامد و مایع LG بدون انجام کشت میکروبی به عنوان کنترل منفی یا شاهد نیز در آزمایش در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری نیتروژن در کشت‌های جامد و مایع از روش کج‌دال استفاده شد (لیلاسی و ساریخانی ۱۳۹۷).

روش نیمه کمی و کمی حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات)

برای انجام این آزمون‌ها از محیط کشت اسپربر (اسپربر ۱۹۵۸) استفاده شد که در این محیط تری‌کلسیم فسفات به عنوان تنها منبع فسفر بود. در حالت نیمه‌کمی برای هر سویه باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته و سطح هر پتری به سه قسمت مساوی تقسیم شد، مرکز هر قسمت با ۵ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری تلقیح و ظروف پتری تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. تمامی پلیت‌ها در چهار

⁴ Colony Diameter

⁵ Halo Diameter

دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول صاف رویی با ۴ میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (اختلاط یک میلی‌لیتر محلول $(FeCl_3)$ ۰/۵ مولار با ۵۰ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۳۵٪) مخلوط شد (هی و همکاران ۲۰۰۲). این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید و مقدار تولید IAA توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد تهیه شده در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر IAA محاسبه شد (دیگر و همکاران ۲۰۱۱). آزمایش با لحاظ کردن فاکتور تریپتوفان به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

رسوب داده شد و از بخش محلول رویی برای تعیین میزان پتاسیم آزاد شده استفاده شد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸).

توان تولید اکسین

توان تولید ایندول استیک اسید (IAA) جدایه‌های باکتریایی موجود در کودهای زیستی با استفاده از محیط LB محیط انجام گرفت (خوشرو و همکاران ۲۰۱۵). محیط‌های کشت با و بدون L- تریپتوفان مورد سنجش قرار گرفتند. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر L- تریپتوفان و محیط فاقد تریپتوفان منتقل شد و بعد از ۷۲ ساعت، سوسپانسیون باکتری در

جدول ۲- اجزای محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون‌ها

اجزای محیط کشت ($g L^{-1}$)	محیط کشت
Peptone 10; NaCl 10; Yeast Extract 5	LB
Peptone 5; NaCl 5; Yeast Extract 1.5; Meat extract 1.5	NB
Glucose 10; Yeast extract 0.5; $CaCl_2$ 0.1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25; $Ca_3(PO_4)_2$ 2.5; Agar 15.	Sperber
Glucose 5; $Ca_3(PO_4)_2$ 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5; $FeCl_3$ 0.005; $CaCO_3$ 0.1; Mica 2	Aleksandrov
Sucrose 20; K_2HPO_4 0.05; KH_2PO_4 0.15; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2; $CaCO_3$ 1; $CaCl_2$ 0.01; $FeCl_2$ 0.01; $Na_2MoO_4 \cdot 4H_2O$ 0.002; Agar 15.	LG

گرفت. در ادامه رشد قارچ و باکتری‌ها و وجود فعالیت ضد قارچی باکتری‌ها پایش گردید (هاجج ۲۰۱۰).

شناسایی جدایه‌ها

برای شناسایی جدایه‌های حاصل از کودها از روش مولکولی و از آغازگرهای موجود در جدول ۳ استفاده شد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۹). رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی ساده در صورت لزوم برای تأیید حضور جنس‌های مورد ادعا انجام گرفت (خوشرو و همکاران ۲۰۱۵a). برای رسم درخت فیلوژنتیک، توالی ژن 16S rRNA باکتری مورد نظر با توالیهای 16S rRNA سایر باکتری‌های مشابه در بانک ژنی از طریق BLAST-N مقایسه شد. سپس توالیها با نرم افزار MEGA6 همردیفی شدند. آنالیز فیلوژنی و رسم درخت فیلوژنتیک از طریق روش Neighbor-

آزمون فعالیت ضد قارچی جدایه‌ها

برای این آزمون از قارچ فوزاریوم سولانی^۸ سویه P8 (دریافت شده از آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز) به‌عنوان بیماریزای گیاهی استفاده شد. با توجه به این‌که این قارچ از قارچ‌های مهم در ایجاد بیماری در گیاهان به شمار می‌آید لذا در این پژوهش فعالیت باکتری‌ها علیه این قارچ نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای اینکار از تکه‌های کشت قارچ فوزاریوم در ابعاد ۰/۵ سانتی‌متر مربع در مرکز پلیت حاوی محیط کشت جامد LB استفاده شد. در هر پلیت ۴ باکتری به صورت نقطه‌ای کشت داده شد و انکوباسیون به مدت یک هفته و در دمای ۲۶ درجه سلسیوس انجام

⁸ *Fusarium solani* P8

سویه‌ها انجام گردید (تامورا و همکاران ۲۰۰۷).

joining phylogeny و آنالیز 1000 Bootstrapping

(replicates) به منظور تخمین قابل اطمینان وابستگی

جدول ۳- آغازگرهای عمومی برای تکثیر 16S rDNA باکتری‌ها.

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

نتایج

در مجموع هشت جدایه از سه کود زیستی بدست آمد (کود زیستی پتابارور فاقد باکتری بود)، از کود ازتوبارور دو جدایه (Az1 و Az2)، از کود روئین سه جدایه (R1، R2 و R3) و از کود فسکو سه جدایه (P1، P2 و P3) جداسازی شدند.

شمارش جمعیت میکروبی

نتایج حاصل از شمارش جمعیت میکروبی در جدول ۴ آورده شده است. بر اساس شیوه‌نامه ثبت کودی موسسه خاک و آب (۱۳۹۳)، حد استاندارد جمعیت میکروبی در کودهای زیستی 1×10^7 CFU/g می‌باشد. بر این اساس با توجه به نتایج جدول ۱ مشاهده می‌شود که تنها دو کود زیستی ازتوبارور و روئین تعداد جمعیت میکروبی قابل قبول بوده و از استاندارد تبعیت می‌نمایند.

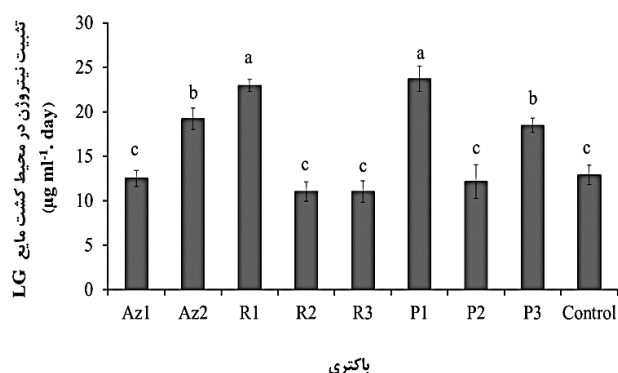
جدول ۴- جمعیت میکروبی کل در کودهای زیستی مورد آزمایش.

کود زیستی	ازتوبارور	پتابارور	روئین	فسکو
جمعیت میکروبی ($CFU g^{-1}$)	$3/5 \times 10^8$	فاقد جمعیت میکروبی	$5/2 \times 10^8$	$6/9 \times 10^3$

میزان تثبیت نیتروژن در محیط کشت جامد و مایع

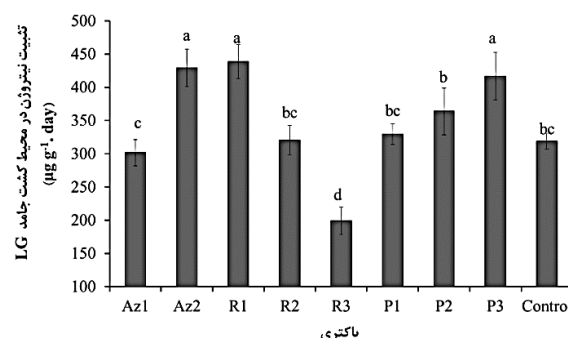
نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین میزان تثبیت نیتروژن در مدت زمان رشد باکتری، در جدایه‌های R1 و Az2 به ترتیب برابر با ۴۳۸/۶۶ و ۴۲۹/۳۴ میکروگرم نیتروژن به ازاء هر گرم محیط کشت بوده که باهم در یک گروه آماری هستند اما با اختلاف ۲۷ درصدی نسبت به شاهد بدون باکتری، دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$). جدایه P3 نیز در رتبه بعدی قرار داشت و جدایه‌های P1، R2 و Az1 هم با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند و کمترین میانگین تثبیت نیز مربوط به جدایه R3 بود (شکل ۱). در اندازه‌گیری مقدار تثبیت نیتروژن به روش کجلدال در محیط کشت مایع LG، نتایج نشان داد که بیشترین میزان تثبیت در جدایه‌های P1 و R1 بود که به ترتیب برابر با ۲۳/۷ و ۲۲/۹۶ میکروگرم نیتروژن به

ازاء هر میلی‌لیتر محیط بود که با افزایش ۴۴ درصدی، اختلاف آماری معنی‌دار با شاهد داشت. پس از آن جدایه‌های Az2 و P3 قرار داشتند. جدایه‌های P2، R3 و R2 با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند. همبستگی اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن جدایه‌ها در دو روش جامد و مایع برابر با $r = 0.764^*$ به دست آمد. هر چند روش اصولی برای ارزیابی تثبیت نیتروژن باکتری روش احیا استیلین می‌باشد (ساریخانی ۲۰۱۶) ولی استفاده از روش کجلدال هر چند دارای دقت پایینی می‌باشد (لیلاسی و ساریخانی ۲۰۱۸)، اما در مواردی که دسترسی به شیوه احیاء گاز استیلین به اتیلن نباشد می‌تواند اطلاعات مفیدی را در اختیار قرار دهد (شکل ۲).



شکل ۲- میزان تثبیت نیتروژن جدایه‌های باکتری در محیط کشت مایع LG پس از گذشت ۷ روز. جدایه‌های Az1 و Az2 از ازتوبارور، جدایه‌های R1، R2 و R3 از روئین و جدایه‌های P1، P2 و P3 از فسکو بدست آمده‌اند.

مشخص کرد که از ۸ جدایه مورد بررسی تنها ۲ جدایه Az1 و Az2 می‌توانند در محیط جامد اسپربر تشکیل هاله بدهند. جدایه‌های Az1 و Az2 به ترتیب با مقادیر ۲/۳۴ و ۲/۲۷ برای نسبت HD/CD بعد از گذشت ۱۲ روز بیشترین توانایی انحلال فسفات معدنی را داشتند. تأثیر این دو جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های نامحلول در زمان‌های مختلف نیز در سطح یک درصد معنی‌دار بود. در این دو جدایه نسبت HD/CD با گذشت زمان افزایش یافت. جدایه‌های P1، P2، P3، R1، R2 و R3 هیچگونه هاله‌ای در محیط جامد تشکیل ندادند (شکل ۳). توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی را می‌توان به عنوان یکی از پتانسیل‌های مهم تحریک رشد گیاه توسط باکتری‌های PGPR در نظر گرفت. این توانایی در شرایط درون شیشه در تعداد زیادی از ریزجانداران مشاهده شده است (وایتلاو و همکاران ۱۹۹۹، خوشرو و همکاران ۲۰۱۷b). در بخش آزمون کمی، برای جدایه‌های Az1 و Az2 بیشترین میزان حل‌کنندگی فسفر به ترتیب با مقادیری برابر با ۴۱۶/۰۶ و ۳۷۸/۸ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان حل‌کنندگی در جدایه P1 (۵۹/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) بدست آمد (شکل ۴). با وجود آنکه جدایه‌های P1، P2، P3، R1، R2 و R3 در محیط جامد قادر به تشکیل هاله شفاف نبودند ولی در محیط مایع قادر به انحلال فسفات به مقدار اندکی بودند. علت این



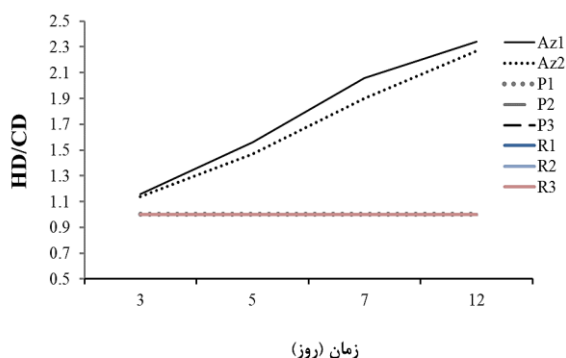
شکل ۱- میزان تثبیت نیتروژن جدایه‌های باکتری در محیط کشت جامد LG پس از گذشت ۷ روز. جدایه‌های Az1 و Az2 از ازتوبارور، جدایه‌های R1، R2 و R3 از روئین و جدایه‌های P1، P2 و P3 از فسکو بدست آمده‌اند.

در مطالعه‌ای کانیموژی و پانیرسلوام (۲۰۱۰) توانایی تثبیت نیتروژن آزوسپیریوم را به وسیله روش میکروکجدال در محیط کشت نیمه‌جامد فاقد نیتروژن همراه مالات مورد سنجش قرار دادند. از بین ۳۰ ایزوله مورد آزمایش، ۲۸ جدایه قادر به تثبیت نیتروژن بودند که دامنه توانایی تثبیت نیتروژن آن‌ها از ۳/۳ تا ۱۵/۶ (mgN g⁻¹) متغیر بود و در بین آن‌ها فقط ۱۰ ایزوله قادر به تولید بیشترین مقدار نیتروژن بودند. کیزلیکایا (۲۰۰۹) با بررسی ظرفیت تثبیت نیتروژن ازتوباکتر در محیط کشت (از خاک‌های شمال آناتولی ترکیه) گزارش داد که مقدار تثبیت نیتروژن بین ۳/۵ تا ۲۹/۴۵ و میانگین ۱۰/۲۴ (mg L⁻¹) در محیط کشت بوده است. تفاوت در نتایج آزمایشات و مقادیر نیتروژن تثبیت شده را می‌توان به گونه باکتری‌ها، نوع محیط سنجش، مدت زمان سنجش و بعضاً روش‌های مورد استفاده در تعیین کارایی باکتری‌ها نسبت داد.

آزمون کیفی و کمی توان حل‌کنندگی تری‌کلسیم فسفات

اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD)

(۲۰۱۷c). بررسی ضریب همبستگی بین میزان انحلال فسفات در دو روش ($r=0/98^{**}$) به دست آمد که کاملاً معنی‌دار و مثبت می‌باشد. گفتنی است که کود زیستی فسکو با وجود اینکه بعنوان کود زیستی فسفات شناخته می‌شود ولی عدم وجود توان حل‌کنندگی فسفات کم محلول توسط سویه‌های جدا شده از این کود (P1, P2 و P3) مشخص گردید.



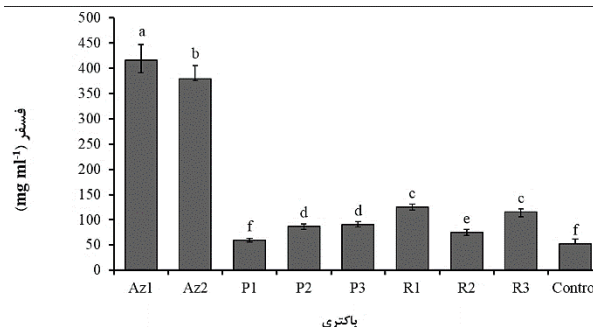
شکل ۳- مقایسه نسبت HD/CD ۸ جدایه در ارزیابی کیفی انحلال فسفات معدنی پس از گذشت ۱۲ روز. جدایه‌های Az1 و Az2 از انزوبارور، جدایه‌های R1، R2 و R3 از روئین و جدایه‌های P1، P2 و P3 از فسکو بدست آمده‌اند.

(خوشرو و همکاران ۲۰۱۵a).

رها سازی پتاسیم از کانی‌های میکا

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قدرت رهاکنندگی پتاسیم از کانی‌های موسکویت و بیوتیت نشان داد که سویه‌های فوق دارای اثر معنی‌دار بر رها سازی پتاسیم هستند. طبق انتظار، جدایه‌ها توانستند پتاسیم بیشتری از بیوتیت در مقایسه با موسکویت آزاد کنند. در میکای سیاه (بیوتیت) جدایه‌های Az1 و P1 به ترتیب با ۱۳/۷۰ و ۱۳/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین توان را در آزادکنندگی پتاسیم نشان دادند و در میکای سفید (موسکویت) جدایه‌های Az1، P2 و Az2 به ترتیب با ۴/۶۷، ۴/۵ و ۴/۳۳ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین توان را در آزادکنندگی پتاسیم نشان دادند (شکل ۵). در بین

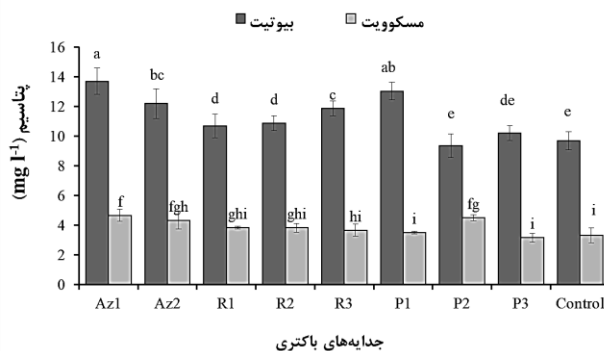
امر می‌تواند به تفاوت شرایط انجام آزمایش در دو حالت جامد و مایع باشد به طوری که در حالت جامد مقدار کمتری از سوبسترا در اختیار باکتری قرار می‌گیرد در حالی که در حالت مایع به دلیل وجود تکان‌های شیکر دسترسی سوبسترا برای باکتری کاملاً فراهم شده و می‌تواند مقدار بیشتری از تری کلسیم فسفات را حل کند (خوشرو و همکاران ۲۰۱۵a، خوشرو و همکاران



شکل ۴- میزان انحلال فسفات معدنی جدایه‌ها در روش ارزیابی کمی پس از گذشت ۱۲ روز. جدایه‌های Az1 و Az2 از انزوبارور، جدایه‌های R1، R2 و R3 از روئین و جدایه‌های P1، P2 و P3 از فسکو بدست آمده‌اند.

در پژوهشی چهار نوع کود زیستی رایج در کشور شامل بارور ۲، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین مورد بررسی قرار گرفت و جدایه‌های مورد استفاده در آنها Ba1 و Ba2 از بارور ۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس و N1، N2، N3، N4 و N5 از نیتروکسین در شرایط آزمایشگاهی از نظر انحلال فسفات معدنی به روش کیفی و کمی ارزیابی شدند. در ویژگی انحلال فسفات معدنی از منبع تری کلسیم فسفات به دو روش کیفی و کمی، جدایه Ba1 با ایجاد بیشترین نسبت HD/CD (۳/۲) و انحلال فسفات به میزان ۶۰۶/۴ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین توان انحلال فسفات بود. توان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های ذکر شده به روش کمی در محدوده ۶۰۶/۴-۷۷/۱۵ میلی‌گرم بر لیتر بود

جدایه‌ها، Az1 در حضور هر دو کانی پتاسیم، بیشترین آزادسازی پتاسیم را داشت.

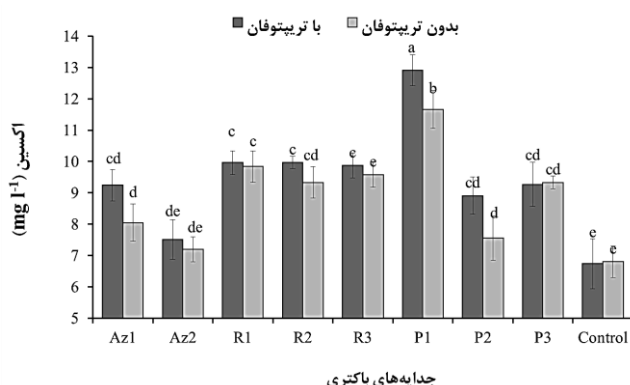


شکل ۵- مقادیر آزادسازی پتاسیم از کانی میکا توسط جدایه‌ها پس از گذشت ۷ روز. جدایه‌های Az1 و Az2 از ازتوبارور، جدایه‌های R1، R2 و R3 از روئین و جدایه‌های P1، P2 و P3 از فسکو بدست آمده‌اند.

توان تولید اکسین در جدایه‌ها

نتایج تجزیه واریانس اثر جدایه‌ها بر تولید اکسین نیز نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر مقدار تولید هورمون اکسین (IAA) تفاوت کاملاً معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. نتایج حاصل از ارزیابی کمی توان تولید هورمون اکسین در ۸ جدایه نشان داد که همه باکتری‌های مورد مطالعه قادر به تولید هورمون اکسین بودند. به نظر می‌رسد توانایی تولید هورمون اکسین (IAA) به عنوان یکی از اصلی‌ترین شاخص‌های محرک رشد گیاهی، در بخش عمده‌ای از جدایه‌های مورد نظر قابل مشاهده است. بیشترین مقدار تولید هورمون اکسین توسط جدایه P1 معادل ۱۲/۹۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین مقدار آن توسط جدایه Az2 و معادل ۶/۷۴ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (شکل ۶). به گزارش بنزری و همکاران (۱۹۹۸)، توان تولید اکسین در یک سویه از باکتری *Sordomonas پوتیدا* با افزایش غلظت تریپتوفان در محیط کشت افزایش معنی‌داری یافت. بریک و همکاران (۱۹۹۱) با مطالعه تولید اکسین توسط ۵۳ جدایه که مربوط به جنس‌های مختلف بودند به این نتیجه رسیدند که این جدایه‌ها می‌توانند به میزان ۱/۳ تا ۷ میلی‌گرم در لیتر اکسین تولید نمایند. تولید بیشتر IAA در یک جدایه نسبت به جدایه دیگر احتمالاً به دلیل استفاده بهتر از ترکیبات محیط توسط آن جدایه می‌باشد (رجایی و همکاران ۲۰۰۷).

با توجه به این که بیش از ۹۸ درصد پتاسیم موجود در خاک به شکل کانی‌های اولیه و کانی‌های سیلیکاته (میکروکلین، موسکویت، ارتوکلانز، بیوتیت، فلدسپار، ایلیت و غیره) می‌باشد (سوگوموران و جانارتانام ۲۰۰۷)، لذا باکتری‌های با توان آزادسازی پتاسیم مورد توجه قرار می‌گیرند. باکتری *B. muciliginosus* سال‌های زیادی است که به عنوان کود زیستی پتاسیم در برخی از کشورها از جمله چین مورد استفاده قرار می‌گیرد (جنون و همکاران، ۲۰۰۳). لیو و همکاران (۲۰۰۶) در آزمایشی به بررسی میزان انحلال کانی‌های میکروکلین، موسکویت و اورتوکلانز در حضور باکتری *B. muciliginosus* MCRCp1 پرداختند و بیشترین میزان رهاسازی پتاسیم به مقدار ۴/۲۹ میلی‌گرم در لیتر با کانی میکای موسکویت مشاهده کردند. در یک پژوهش چهار سویه متعلق به جنس *Sordomonas* (S10-3، S14-3، S19-1 و S21-1) و یک سویه از *ازتوباکتر* (SP16) از نظر توان آزادسازی پتاسیم مورد آزمایش قرار گرفتند. بالاترین مقدار آزادسازی پتاسیم در بین سویه‌ها مربوط به *Pseudomonas sp.* S14-3 بود که اختلاف ۷۳ درصدی با شاهد بدون باکتری داشت. توان آزادسازی پتاسیم جدایه‌ها از کانی بیوتیت بطور متوسط ۳۷ درصد بالاتر از کانی موسکویت بود (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶).



شکل ۶- تولید اکسین (IAA) توسط جدایه‌ها پس از گذشت ۳ روز. جدایه‌های Az1 و Az2 از ازتوبارور، جدایه‌های R1، R2 و R3 از روئین و جدایه‌های P1، P2 و P3 از فسکو بدست آمده‌اند.

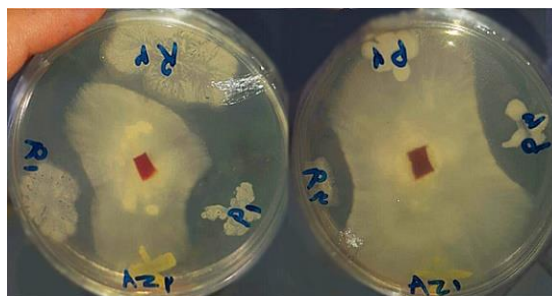
این باکتری‌ها بشدت باعث سرکوب این قارچ بیماریزا گردید و میزان بازدارندگی بالای ۸۰٪ گزارش شد. شناسایی این باکتری‌ها نشان داد که هر سه متعلق به *Pseudomonas alcaligenes* می‌باشند (ویدنیانا و همکاران ۲۰۱۱).

نتیجه شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی باکتری‌ها

بعد از انجام آزمونهای فوق، جدایه‌های توانمند در هر آزمایش مشخص گردیده و اقدام به شناسایی آنها شد. از بین ۸ جدایه، ۴ باکتری (جدایه‌های توانمند) انتخاب شده و مورد شناسایی قرار گرفتند.

فعالیت ضد قارچی جدایه‌ها

برای این آزمون از قارچ بیماریزای گیاهی فوزاریوم سولانی استفاده شد. جهت بررسی اثرات ضد قارچی باکتری‌های انتخاب شده از روش بررسی چشمی^۹ بر روی محیط جامد LB استفاده شد. همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود جدایه‌های P1، P3، R1 و R3 دارای فعالیت ضد قارچی بودند.



شکل ۷- اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها در برابر قارچ بیماریزای فوزاریوم سولانی. جدایه‌های Az1 و Az2 از ازتوبارور، جدایه‌های R1، R2 و R3 از روئین و جدایه‌های P1، P2 و P3 از فسکو بدست آمده‌اند.

در پژوهشی مشخص شده که سویه‌های باکتریایی KtS1، TrN2 و TmA1 جدا شده از ریزوسفر لگوم‌ها دارای اثر آنتاگونیستی بالایی در برابر قارچ بیماریزای *Fusarium oxysporum* (عامل پژمردگی گوجه فرنگی) بودند. استفاده از سوسپانسیون حاوی

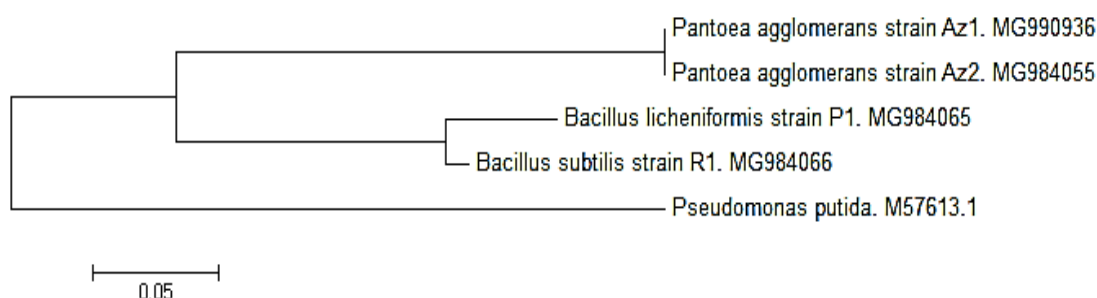
⁹ Visual agar plate assay

جدول ۵- نتایج تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های منتخب

ردیف	سویه باکتری	اکسیداز	کاتالاز	گلوکز	لاکتوز	ژلاتین	سیترات	اوره آز	نشاسته
۱	Az1	-	+	+	+	-	+	-	-
۲	Az2	-	+	+	+	-	+	-	-
۳	P1	+	+	+	+	-	+	-	+
۴	R1	-	+	+	+	-	+	-	+

جدول ۶- نتایج شناسایی باکتری‌ها

ردیف	سویه باکتری	رنگ آمیزی گرم	شکل	شناسایی
۱	Az1	گرم منفی	باسیل - دیپلوباسیل	<i>Pantoea agglomerans</i>
۲	Az2	گرم منفی	کوکوباسیل - دیپلوباسیل	<i>Pantoea agglomerans</i>
۳	P1	گرم مثبت	باسیل	<i>Bacillus licheniformis</i>
۴	R1	گرم مثبت	باسیل ریز	<i>Bacillus subtilis</i>



شکل ۸- درخت فیلوژنتیکی باکتری‌های توانمند در ویژگی‌های محرک رشد گیاه همراه با کد دسترسی. باکتری *Pseudomonas putida* بعنوان outgroup آورده شده است.

نتیجه‌گیری کلی

از نظر جمعیت میکروبی دارای جمعیت استاندارد بودند. بر اساس شیوه نامه ثبت مواد کودی موسسه تحقیقات خاک و آب حد استاندارد جمعیت میکروبی در کودهای زیستی $10^7 \times 1$ CFU/g می‌باشد. نتایج ارزیابی ویژگی افزایشی رشد گیاه در هشت جدایه بدست آمده از این کودها (از کود ازتوبارور دو جدایه Az1 و Az2، از کود روئین سه جدایه R1، R2 و R3 و از کود فسکو سه جدایه P1، P2 و P3) نیز نشان داد که هر چند ویژگی تثبیت نیتروژن در جدایه‌های به دست آمده از کود ازتوبارور مشاهده می‌شود اما این ویژگی در کود زیستی روئین و فسکو نیز مشاهده شد. فعالیت ضد قارچی در کود زیستی روئین منطبق بر ادعای شرکت سازنده دیده شد ولی این آزمایش مشخص ساخت که

در این پژوهش ارزیابی ویژگی‌های افزایشی رشد گیاه و نیز شمارش جمعیت میکروبی برای چهار نوع کود زیستی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. کودهای زیستی ازتوبارور (دارای ویژگی تثبیت نیتروژن)، پتابارور (دارای ویژگی آزادکنندگی پتاسیم) و روئین (به‌عنوان قارچ‌کش زیستی) توسط شرکت زیست فناوری سبز تولید شده‌اند و کود زیستی فسکو (حاوی باکتری‌های حل‌کننده فسفر) محصول شرکت هندی می‌باشند. نتایج ارزیابی چهار نوع کود زیستی مذکور نشان داد که کود پتابارور فاقد جمعیت میکروبی بوده و کود فسکو نیز دارای جمعیت کمتری از حالت استاندارد می‌باشند. کودهای زیستی ازتوبارور و روئین

ویژگی‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه دارای وضعیت مطلوبی می‌باشد اما جمعیت میکروبی آن کمتر از حد استاندارد می‌باشد. از میان کودهای مورد آزمایش در این تحقیق تنها کود زیستی رویین از نظر استانداردهای مورد ارزیابی تمام جوانب مورد آزمایش این تحقیق را تامین نمود.

جدایه‌های بکار رفته در کود زیستی فسکو نیز دارای فعالیت ضد قارچی هستند. در جمع‌بندی نتایج این تحقیق می‌توان گفت که کودهای زیستی رویین و ازتوبارور دارای کیفیت مطلوب از نظر جمعیتی و ویژگی‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه می‌باشند هرچند باکتری /ازتوباکتر بر اساس ادعای شرکت سازنده در این کود ازتوبارور شناسایی نشد. کود فسکو هرچند که از نظر

منابع مورد استفاده

- Adesemoye AO and Kloepper JW, 2009. Plant microbe's interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1–12.
- Bashan Y and de-Bashan LE, 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy* 108: 77–136.
- Benizri E, Courtade A, Picard C and Guckert A, 1998. Role of Maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas putida* M6.1. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1481-1484.
- Bric J, Bostock M and Silverstone SE, 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57:755 -760.
- Deaker R, László Kecskés M, Timothy Rose M, Amprayn K, Krishnen G, ThiKimCuc T, Thuy Nga V, Thi Cong P, Thanh Hien N and Kennedy I, 2011. Practical methods for the quality control of inoculant biofertilizers. ACIAR (Australian Centre for International Agricultural Research).
- Haggag WM, 2010. Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases. *Life Science Journal* 7: 57- 62.
- He Y, Oyaizu H and Suzuki S, 2002. Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Current Microbiology* 47: 138–143.
- Heidarpour A, Aliasgharzad N, Khoshmanzar E, Khoshru B and Asgari Lajayer B, 2019. Bio-removal of Zn from contaminated water by using green algae isolates. *Environmental Technology & Innovation* 16: 330-343.
- Husen E, Simanungkalit RD, Saraswati R and Irawan J, 2007. Characterization and quality assessment of Indonesian commercial biofertilizers. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 98: 31-38
- Jeon JS, Lee SS, Kim HY, Ahn TS and Song HG, 2003. Plant growth promoting in soil by some inoculated microorganisms. *Journal of Microbiology* 41(4) 271- 276.
- Kanimozhi K and Panneerselvam A, 2010. Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum spp.* isolated from Thanjavur district. *Der Chemica Sinica* 1: 138-145.
- Khoshmanzar E, Aliasgharzad N, Neyshabouri MR, Khoshru B, Arzanlou M and Asgari Lajayer B, 2019. Effects of *Trichoderma* isolates on tomato growth and inducing its tolerance to water-deficit stress. *International Journal of Environmental Science and Technology* 17(2):869-78.
- Khoshru B, Aliasgharzad N, Jodmand A, 2019a. The Effect of pH adjustment of municipal compost on its enrichment with plant growth promoting bacterium "*Enterobacter Cloacae*". *Journal of Soil Biology* 7 (1): 103-112. (In Persian).
- Khoshru B and Sarikhani MR, 2019b, Effect of phosphatic microbial fertilizers produced from phosphate solubilizing bacteria on phosphorus uptake and growth of maize. *Iranian Journal of Soil Research* 33 (1): 13-24. (In Persian).
- Khoshru B, Sarikhani MR and Aliasgharzad N. 2019c, Inoculation effect of some phosphatic microbial fertilizers on nutritional indices of *Zea mays* L. *Water and Soil Science-University of Tabriz* 29 (2): 15-27. (In Persian).
- Khoshru B and Sarikhani MR, 2018. Isolation and identification of temperature resistant phosphate solubilizing bacteria for use in phosphatic microbial fertilizer. *Journal of Water and Soil* 32 (1): 155-167. (In Persian).

- Khoshru B, Sarikhani MR and Ebrahimi M, 2017a. Isolation of temperature resistant phosphate solubilizing bacteria for use in phosphatic microbial fertilizer. The 15th Congress of Soil Science. 6-8 September. Isfahan. Iran. (In Persian).
- Khoshru B, Sarikhani MR and Aliasghar zad N, 2017b. Application and non-application of sulfur in the formulation of *Pseudomonas fluorescens* phosphatic microbial fertilizer on corn (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural Sciences and Sustainable Production-University of Tabriz 27(3):119-136. (In Persian).
- Khoshru B, Sarikhani MR and Lotfollahi A, 2017c. Inoculation effect of some phosphatic microbial fertilizers prepared using thermal resistant PSB on *Zea mays*. The 15th Congress of Soil Science. 6-8 September. Isfahan. Iran. (In Persian).
- Khoshru B, Sarikhani MR, Aliasghar zad N and Zare P, 2015a. Assessment the important PGPR features of isolates used in biofertilizers Barvar2, Biosuperphosphate, Supernitroplus and Nitroxin, Applied Soil Research 3(1): 39-52. (In Persian).
- Khoshru B, Sarikhani MR and Aliasghar zad N, 2015b. Molecular and biochemical identification of the bacterial isolates used in common biofertilizers in Iran. Water and Soil Science-University of Tabriz 25(4.2): 13-26. (In Persian).
- Kizilkaya R, 2009. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. Journal of Environmental Biology 31: 73- 82.
- Leylasi Marand M and Sarikhani MR. Evaluation of nitrogen fixing efficiency of some *Azotobacter* isolates in solid and liquid LG medium by Kjeldahl method. Water and Soil 28(2): 205-215. (In Persian)
- Liu W, Xu X, Wu X, Yang Q, Luo Y and Christie P, 2006. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. Environmental Geochemistry and Health 28:133-140.
- Motsara MR and Roy RN, 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The University of Michigan, USA.
- Rajai S, Alikhani HA and Raeisi F, 2007. Effect of plant growth promoting potentials of *Azotobacter chroococcum* native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat. Science and Technology Journal of Agriculture and Natural Resources 41: 296-285.
- Sarikhani MR and Ansari S, 2015. Evaluation of some qualitative characteristics of common biofertilizers in Iran. Sustainable Agriculture 1-14. (In Persian)
- Sarikhani MR, 2016. Increasing potassium (K) release from K-containing minerals in the presence of insoluble phosphate by bacteria. Biological Journal of Microorganism 4: 87-96.
- Sarikhani MR, Khoshru B and Greiner R. 2019. Isolation and identification of temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria as a potential microbial fertilizer. World Journal of Microbiology and Biotechnology 35(8): 126-139.
- Sarikhani MR, Aliasghar zad N and Khoshru B, 2018. Effectiveness study of phosphate solubilizing bacteria in the formulation of phosphatic microbial fertilizers on Corn. Iranian Journal of Soil and Water Research 3(1): 81-71. (In Persian).
- Sarikhani MR, Khoshru B and Oustan S, 2016. Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under in-vitro conditions. Geomicrobiology Journal 33(9): 832-838.
- Sperber JI, 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research 9: 782-787.
- Sugumaran P and Janarthanam B, 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agriculture Sciences 3: 350-335.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kunars S, 2007. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24(8):1596-9
- Teaumroong N, Wanapu C, Chankum Y, Arjharn W, Sang-Arthit S, Teaimthaisong K and Boonkerd N, 2010. Production and Application of Bioorganic Fertilizers for Organic Farming Systems in Thailand. Microbes at Work, Springer, Berlin Heidelberg.
- Vessey JK, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-586.
- Whitelaw MA, Harden TJ and Helyar KR, 1999. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Soil Biology and Biochemistry 31: 655-665.
- Widnyana IK, Suprpta DN, Sudana IM and Temaja IGRM, 2011. *Pseudomonas alcaligenes*, potential antagonist against *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersicum* the cause of *fusarium* wilt disease on tomato. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare 3:163-169.