نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۳ شماره ۲ صفحه‌های ۲۴۳ تا ۲۵۶/ سال ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

کارایی چند حامل مایع در افزایش زنده‌مانی باکتری *Enterobacter cloacae* S16-3 و اثر زادمایه‌های تهیه شده بر جوانه‌زنی و رشد بذور گندم

فاطمه قاسمی پیرانلو[۱]، محمدرضا ساریخانی[۲*]، نصرت اله نجفی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۵

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

چکیده

در کشاورزی پایدار کودهای زیستی جایگاه ویژه‌ای دارند. برای عرضه آن‌ها از حامل‌های مختلف برای حفظ ماندگاری و زنده‌مانی باکتری استفاده می‌شود. این تحقیق با هدف بررسی زنده‌مانی باکتری *Enterobacter cloacae* S16-3 بر روی حامل‌های مختلف مایع در مدت زمان یک سال انجام پذیرفت. زادمایه‌های مایع شامل ۹ تیمار با ترکیب گلیسرول، پلی اتیلن گلیکول (PEG)، ترهالوز، کربوکسی متیل سلولز (CMC)، صمغ عربی، پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP)، گلوکز و نشاسته با مقادیر مشخص و در حالات تلفیقی مختلف بودند. در این بررسی، زادمایه‌های باکتریایی تهیه شده با جمعیت اولیه یکسان (10^9CFU mL^{-1}) پس از نگهداری در دمای اتاق، از نظر توان ماندگاری و زنده‌مانی باکتری مورد مقایسه قرار گرفتند. جمعیت باکتری در زمان‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۷۰ و ۳۶۵ روز شمارش شد. برای شمارش باکتری‌های زنده در زادمایه‌های میکروبی، بعد از تهیه سری‌های رقت از روش شمارش در کشت نواری درون یک پلیت استفاده گردید. همچنین در این تحقیق اثرات زادمایه‌های تهیه شده بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم در شرایط استریل و به دو روش کشت در پلیت شیشه‌ای و کشت گلدانی بررسی شد. در کشت گلدانی خصوصیاتی از قبیل طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از شمارش باکتری‌ها نشان داد که از میان زادمایه‌های مایع، بیشترین جمعیت شمارش شده بعد از گذشت یک سال در فرمولاسیون F_5 (صمغ عربی، نشاسته و PEG) (10^7CFU mL^{-1}) و کمترین جمعیت شمارش شده در فرمولاسیون F_7 (گلیسرول، ترهالوز، گلوکز، صمغ عربی و PEG) به دست آمد، به‌طوریکه بعد از گذشت ۶ ماه، هیچ جمعیت زنده باکتری شمارش نگردید. همچنین نتایج حاصل از تست جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم در پلیت نشان داد که مواد مورد استفاده در زادمایه‌های میکروبی اثر بازدارنده بر جوانه‌زنی بذرها نداشته و حتی در مواردی باعث ترغیب رشد و بهبود جوانه‌زنی و رشد آن‌ها گشته‌اند. به طوری که تمامی بذور مورد استفاده درحضور مایه‌های تلقیح به طور همزمان شروع به جوانه‌زنی نمودند. در کشت گلدانی نیز فرمولاسیون F_9 (گلیسرول، گلوکز، صمغ عربی و PEG) و F_4 (ترهالوز، صمغ عربی و PEG) از نظر وزن تر ریشه (به ترتیب ۱۰۲۰ و ۷۴۰ میلی‌گرم) و وزن تر کل (۱۸۰۰ و ۱۳۹۰ میلی‌گرم) میانگین‌های بالاتری را به همراه داشتند. مقایسه این زادمایه‌ها با تیمارهای شاهد (بدون باکتری و بدون حامل) و سوسپانسیون باکتری (مایه تلقیح بدون حامل) نشان داد که این زادمایه‌ها در تمام خصوصیات اندازه‌گیری شده، توانسته‌اند اثرگذار باشند. با توجه به یافته‌های این پژوهش از میان فرمولاسیون‌های مورد آزمایش، زادمایه F_5 و F_9 در افزایش زنده‌مانی باکتری بهترین نتایج را به همراه داشتند.

واژه‌های کلیدی: حامل، زنده‌مانی باکتری، کودهای زیستی، کشت نواری، گندم، مایه تلقیح مایع

The Efficiency of Several Liquid Carriers to Increase the Survival of *Enterobacter cloacae* S16-3 and the Effects of their Produced Inocula on Germination and Growth of Wheat Seedlings

F Ghasemi Piranlo[1], MR Sarikhani[2*], N Najafi[3]

Received: September 2, 2021 Accepted: April 25, 2022

1-MSc. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran
2-Assoc. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran
3-Prof. of Soil Chemistry and Fertility, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran
*Corresponding Author, Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

Background and Objectives

Biofertilizers play major role in sustainable agriculture. For provide them, different carriers are used to increase the longevity and survival of the bacteria. Biofertilizers are being used in two general forms; solid or liquid. For making biofertilizers, various types of material are used to inoculate seed or soil. A suitable material for carrying microorganisms should have certain characteristics such as high water holding capacity, chemical and physical uniformity, easy to sterilize by autoclaving or gamma-irradiation, absence of toxic compounds for microbial strains, and environmental safety. At the same time, these materials should have a near-neutral or easily adjustable pH and be locally abundant at reasonable cost. Liquid or solid biofertilizers have their own advantages or disadvantages. The aim of this study was to investigate the survival of *Enterobacter cloacae* S16-3 bacterium on different liquid carriers during one year.

Materials and Methods

The liquid carrier consisted of 9 treatments containing glycerol, polyethylene glycol (PEG), trehalose, carboxymethyl cellulose (CMC), arabic gum, polyvinyl pyrrolidone (PVP), glucose and starch with different amounts and in different combinations. In this study, bacterial inoculants prepared with the same initial population (10^9 CFU mL^{-1}) after storage at room temperature were compared for the survival of the bacterium. The bacterial population was counted at 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 270 and 365 days. For counting the bacteria in microbial carriers, after dilution series preparation, bacterial suspension was used in strip culture in a plate. In this research, the effects of prepared inoculants on germination and growth of wheat seedlings in sterile conditions in a plate and pot culture at the end of the fourth month were investigated. In pot culture, characteristics such as shoot and root length, the wet and dry weight of shoot and root, total wet and dry weight of shoot and root were measured.

Results and Discussion

The bacterial counting results showed that among the tested carriers, the most population was counted after one year in formulation F_5 (arabic gum, starch and PEG) (10^7 CFU mL^{-1}) and the lowest population was counted in formulation F_7 (glycerol, trehalose, glucose, arabic gum, and PEG), so that after 6 months no alive cells of bacteria were counted. Also, the results of germination test and growth of wheat seedlings cultivating in a plate showed that the materials used in microbial carriers did not have any inhibitory effect on germination of the seeds, and even, in some cases, they could encourage their germination and growth. So that ten seeds in each inoculum started to germination simultaneously. In pot culture, F9 formulations (glycerol, glucose, arabic gum and PEG), and F4 (trehalose, arabic gum, and PEG) in terms of root fresh weight and total fresh weight had better means. The root fresh weight of the formulations were 1020 and 740 mg and the total fresh weight of 1800 and 1390 mg, respectively. The comparison of these carriers with control (without bacteria and carrier) and suspension of bacteria (non-carrier inoculation) showed that these carriers could be more effective in all measured characteristics.

Conclusions

Currently, the application of different materials in bacterial liquid formulation is considered to be of high importance as an innovative technological strategy to maintain the metabolic stability of microorganisms. Finally, according to the results of this experiment and the convenience and availability of the carriers, the F_5 and F_9 formulations can be suggested for further studies.

Keywords: Bacterial survival, Biofertilizers, Carrier, Liquid inoculum, Strip culture, Wheat

مقدمه

کودهای زیستی به موادی اطلاق می‌شود که شامل یک یا چند ریزجاندار با جمعیت مناسب، به همراه مواد نگهدارنده یا متابولیت‌های تولیدی آن‌ها می‌باشد که به رشد گیاه از طریق مکانیسم‌های مختلف کمک می‌کند (اگامبردیوا و همکاران ۲۰۰٤). برای حفظ جمعیت مشخصی از باکتری‌های مورد نظر در کودهای زیستی برای مدت معین، از موادی به نام حامل استفاده می‌شود که باید قادر به حفظ جمعیت مشخصی از باکتری مورد نظر در مدت معین و به تعداد قابل قبولی باشد. بنابراین مهم‌ترین ویژگی یک حامل توانایی حفظ جمعیت مناسبی از باکتری در فاصله زمانی تولید تا مصرف در مزرعه می‌باشد (قاسمی و همکاران ۲۰۱۹). حامل‌های مایع از جدیدترین نوع حامل‌ها هستند که به دلیل مشکلات ناشی از تلقیح بذور با حامل‌های جامد عرضه شده‌اند، اما به دلایل اقتصادی، فرمولاسیون آن‌ها در انحصار تولیدکنندگان است (تیتابوتر ۲۰۰۵). این مایه تلقیح‌ها مبتنی بر کشت مایع بوده و به صورت روغن‌های معدنی و آلی، سوسپانسیون روغن در آب یا پلیمر می‌باشند (ملوسا و همکاران ۲۰۱۲، زیویر و همکاران ۲۰۰٤). این محیط کشت‌ها به طور معمول شامل منبع کربن، نیتروژن و ویتامین می‌باشند که محرک رشد باکتری هستند. با این حال، مواد افزودنی استفاده شده در مایه تلقیح مایع، کیفیت زادمایه را از طریق افزایش تراکم جمعیت و عمر مفید باکتری بهبود می‌بخشند (تیتابوتر و همکاران ۲۰۰۷). مواد افزودنی مورد استفاده در آماده‌سازی مایه تلقیح مایع، موادی هستند که می‌توانند سلول‌های باکتریایی را در شرایط سخت و تنشی مانند دمای بالا، خشکی و مواد سمی مترشحه از بذرها محافظت کنند. زادمایه‌های مایع با ویژگی‌های خوب می‌توانند با استفاده از مواد کم‌هزینه و به راحتی تولید شوند. این فرمولاسیون به طور مستقیم توسط فرآیند ساده تخمیر، در شرایط استریل تولید، بسته‌بندی و ذخیره می‌شود. این روند تهیه زادمایه مایع، هزینه تولید را نسبت به کاربرد و استریل کردن زادمایه‌های جامد به حداقل می‌رساند. زادمایه مایع می‌تواند با نیروی کار، فضا و انرژی حداقل و همچنین مقدار مایه تلقیح کمتر در مقایسه با حامل‌های جامد مورد استفاده قرار گیرد. از این رو کشاورزان به راحتی می‌توانند این نوع زادمایه را استفاده کنند (هاینس و همکاران ۲۰۰۱، دایامانی ۲۰۱۰، ولیننی و براهماپراکاش ۲۰۱۱). تلاش برای بهبود عملکرد مایه تلقیح و کاهش هزینه‌های آن وجود دارد به صورتی که مواد افزودنی مختلف برای بکارگیری در مایه تلقیح‌های مایع مورد آزمایش بوده و از مواد گوناگونی نظیر نشاسته، گلوکز، ترهالوز، گلیسرول، کربوکسی متیل سلولز، صمغ عربی، پلی ایتلن گلیکول و پلی‌وینیل پیرولیدون برای این امر استفاده می‌شود که دلایلی برای استفاده از این مواد مطرح می‌باشد. به عنوان نمونه؛ PVP[1] ظرفیت جذب آب بالایی دارد و احتمالاً مانع از خشک شدن سریع زادمایه بعد از استفاده می‌شود، همچنین ممکن است به ترکیبات سمی

[1] Polyvinyl pyrrolidone

آزاد شده از بذر، متصل شود و به این صورت از اثرات سمی آن‌ها بکاهد. سازگاری قوی و قوام چسبندگی آن ممکن است چسبندگی سلول و مایه تلقیح را به بذر افزایش دهد. محلول PVP، تمایل به آمیختن با پوسته بذر را دارد که در نهایت به عنوان لایه ضخیم، نقش محافظت‌کننده را ایفا می‌نماید (سینگلتون و همکاران ۲۰۰۲). گلیسرول، یک منبع پلی‌ال ساده و منبع کربن قابل استفاده برای باکتری‌ها می‌باشد. گلیسرول دارای ظرفیت جذب آب بالایی است و ممکن است سلول‌ها را از طریق کاهش سرعت خشک شدن، محافظت کند و حتی به عنوان پوشش بذر نیز عمل می‌کند (ماری و همکاران ۱۹۸۵). این ماده ویژگی ضدیخی نیز دارد و در دماهای پایین همانند پلی اتیلن گلیکول از یخ زدن آب جلوگیری می‌کند. CMC[2] نیز به عنوان منبع کربن قابل استفاده می‌باشد. ترهالوز دی‌ساکاریدی است که به طور گسترده برای افزایش تحمل سلول به خشک شدن و تنش دمایی و اسمزی به کار می‌رود. کاربرد ترهالوز سبب پایاسازی آنزیم‌ها و غشای سلولی شده و با شرایط اسمزی نیز سازگار است (لیپرت و گالینسکی ۱۹۹۲، استریتر ۱۹۸۵). وجود پیوند آلفا ۱-۱ بین دو گلوکز در این ماده باعث شده تا نسبت به دماهای بالا و شرایط اسیدی مقاوم باشد. گلوکز، تولید اگزوپلی‌ساکارید را افزایش می‌دهد، بنابراین می‌تواند سلول‌ها را از خشک شدن سریع در تلقیح محافظت کند (سینگلتون و همکاران ۲۰۰۲). صمغ عربی، یک صمغ طبیعی است که به نام صمغ اقاقیا نیز معروف می‌باشد این ماده مخلوطی از گلیکوپروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها است. ویژگی چسبندگی و تثبیت‌کنندگی آن باعث شده تا در بخش‌های مختلف از آن استفاده شود (خالافالا و دافالا ۲۰۰۸). نشاسته یک ماده ارزان و یکی از فراوان‌ترین بیوپلیمرهای طبیعی می‌باشد. این ماده به عنوان مواد افزودنی، چسب و منبع کربن استفاده می‌شود. کاهش سرعت خشک شدن، توانایی نشاسته برای محافظت از سلول‌ها در شرایط تنش خشکی می‌باشد (جان و همکاران ۲۰۱۱).

تیتابوتر (۲۰۰۷) در توسعه مایه تلقیح مایع برای ریزوبیوم‌ها از حامل‌های مایع مانند صمغ عربی،PVP، آلژینات سدیم، نشاسته کاساوا، PEG و PVA[3] استفاده نمود و گزارش کرد که حامل‌های صمغ عربی، PVP، آلژینات سدیم، PEG و نشاسته کاساوا می‌توانند به عنوان بهترین حامل مورد استفاده قرار گیرند. براهماپراکاش و ساهو (۲۰۱۲) با استفاده از مایه تلقیح شماره ۱ که از مواد افزودنی PVP، مقادیر کم گلیسرول، ترهالوز، آرابینوز، Fe-EDTA و گلوکز مایع تشکیل شده بود و مایه تلقیح شماره ۲ که شامل PVP، مقادیر بالایی از گلیسرول و گلوکز بود، نشان دادند که مایه تلقیح شماره ۲ نسبت به مایه تلقیح شماره ۱ مدت زمان زنده‌مانی را برای باکتری حل‌کننده فسفات *باسیلوس مگاتریوم* افزایش داد. نیتا و همکاران (۲۰۱۲) از مواد مختلفی نظیر ترهالوز، صمغ عربی، ساکارز، گلیسرول، پلی‌اتیلن‌گلیکول ۳۰۰، اسید آسکوروبیک و کربوکسی متیل سلولز در فرمولاسیون زادمایه مایع *ازتوباکتر دیازوتروفیکوس* L1 و *هرباسپیریلوم سروپدیکا* J2 استفاده نمودند و نتایج نشان داد که صمغ عربی و PEG نتایج بهتری در زنده‌مانی باکتریها در میان حامل‌های تهیه شده داشته است. ریورا و همکاران (۲۰۱٤) با ارزیابی پلیمرها که شامل آلژینات سدیم، HPMC[4]، PEG (وزن مولکولی ٤۰۰۰ و ٦۰۰۰)، Carbomer-Carbopol 940 و PVA بودند، نشان دادند که HPMC با آلژینات سدیم به عنوان فرمولاسیون مایع برای زنده‌مانی باکتری *Rhizobium* مناسب می‌باشند. در کل می‌توان این‌گونه بیان کرد که این مواد افزودنی می‌توانند، کیفیت مایه تلقیح را بهبود بخشیده و با ایجاد چسبندگی بهتر

[2] Carboxymethyl cellulose

[3] Polyvinyl alcohol

[4] Hydroxypropyl methylcellulose

به بذر و محافظت باکتری در برابر سموم مترشحه از بذر، بقای باکتری را در مدت ذخیره‌سازی و پس از قرار گرفتن در شرایط زیست‌محیطی فراهم کنند. مقابله با تنش‌های دمایی (گرمای زیاد یا سرمای بیش از حد) و ممانعت از خشک شدن سلول زنده از جمله راه‌های کمک به زنده‌مانی باکتری‌ها می‌تواند باشد.

یکی از شیوه‌های زیستی برای افزایش کمی و کیفی تولید، تلقیح بذر با استفاده از ریزجانداران مفید خاکزی از جمله باکتری‌های محرک رشد گیاه است. تلقیح بذرهای گیاهان با این باکتری‌ها می‌تواند جمعیت آن‌ها را به حد مطلوب رسانده و در نتیجه منجر به بروز اثر مفید آن‌ها گردند (کاکماکی و همکارن ۲۰۰۷). باکتری مورد استفاده در تحقیق حاضر، باکتری *انتروباکتر کلوآسه* می‌باشد. این باکتری باسیلی گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، شیمیوارگانوتروف، اکسیداز منفی، کم توقع از نظر غذایی، تخمیرکننده گلوکز و لاکتوز با تولید گاز و اسید، قادر به احیا نیترات به نیتریت، تحمل دامنه گسترده حرارتی، متحرک و بدون اسپور است که از نظر تاکسونومی در خانواده انتروباکتریاسه طبقه‌بندی می‌گردد (لین و همکاران ۲۰۰۶). *انتروباکتر* با توجه به توان انحلال فسفات، آزادسازی پتاسیم و توان رشد در محیط فاقد نیتروژن (توان تثبیت نیتروژن) به عنوان باکتری محرک رشد گیاه که اثرات مثبت آن در رشد گیاهان در آزمایشات پیشین مشخص شده است (مرادی و ساریخانی ۲۰۱۶، کاظمی اسکوئی و همکاران ۲۰۱۷)، در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. نگاهی به تحقیقات انجام یافته در این زمینه نشان می‌دهد که مواد متنوع در غلظت‌های متفاوتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با توجه به ضرورت بکارگیری حامل مایع مناسب در استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه، هدف این تحقیق مقایسه زادمایه‌های مایع از نظر زنده‌مانی، جهت انتخاب بهترین ماده و ترکیب مورد استفاده برای بکارگیری باکتری *Enterobacter cloacae* S16-3 در تلقیح بذر گندم می‌باشد. شرط اصلی تحقق این امر این است که حامل معرفی شده بتواند جمعیت قابل قبول و مطابق استاندارد جهانی را برای باکتری تأمین نماید.

مواد و روش‌ها

انتخاب باکتری

باکتری مورد استفاده در این تحقیق *Enterobacter cloacae* S16-3 می‌باشد که از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تأمین گردید.

آماده‌سازی زادمایه‌ها و بررسی زنده‌مانی باکتری در تیمارهای حامل

در این آزمایش این ترکیب‌ها پس بررسی اثرات مثبت هر یک از مواد تهیه شدند. در این ترکیب‌ها از گلیسرول، PEG، ترهالوز، CMC، صمغ عربی، گلوکز، PVP و نشاسته بصورت تلفیقی مطابق جدول ۱، بعنوان حامل باکتری استفاده گردید. لازم به ذکر است که نوع مواد بکار رفته، مقدار و تلفیق آنها بر اساس بررسی منابع انجام شده و تیمارهای منتخب گزارش شده از مقالات مختلف بوده است (رجبعلی جماعت و همکاران ۲۰۱۰، اومر و همکاران۲۰۱۰، سریدهار و همکاران ۲۰۰٤، کورتس پاتینا و بونیلو ۲۰۱۵، تیتابوتر و همکاران ۲۰۰۷، نیتا و همکاران ۲۰۱۲، بازیلاح و همکاران ۲۰۱۱، تیتابوتر ۲۰۰۵).

برای تهیه زادمایه‌های مایع ابتدا در فالکون‌های مجزا برای هر تیمار، حامل مایع در حجم ۵ میلی‌لیتر مطابق ترکیب لازم، تهیه شد و در اتوکلاو در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. غلظت‌های مواد مورد استفاده برای حجم نهایی که ۱۰ میلی‌لیتر بود، محاسبه گردید. زیرا ۵ میلی‌لیتر از کشت باکتری نیز به آن افزوده شد. کشت شبانه *انتروباکتر* در محیط NB[5] تهیه شد و جمعیت مناسبی از باکتری به هر یک از حامل‌ها (۵ میلی‌لیتر برای هر حامل) اضافه شد. در این حالت جمعیت اولیه (10^9CFU mL^{-1}) تأمین شد. سپس برای توزیع یکنواخت باکتری بر روی مواد حامل هر فالکون با ورتکس بهم

[5] Nutrient broth

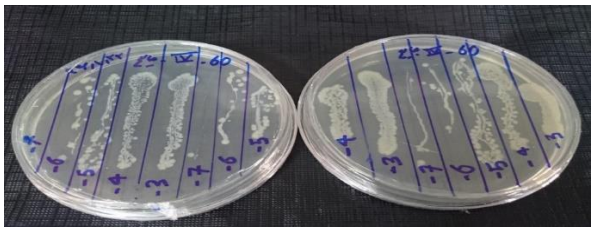
زده شد. برای هر زادمایه مایع ۹ فالکون مجزا (۹ تکرار) برای ۹ زمان شمارش، تهیه شد و بدون هیچ تغییری (ورتکس یا همزدن) در دمای اتاق نگهداری شده و در زمان‌های مورد نظر جمعیت باکتری‌های زنده شمارش شد (ساریخانی ۲۰۱۷).

جدول۱- فرمولاسیون حامل‌های مایع.

فرمولاسیون‌ها	مواد افزودنی
F_1	گلیسرول ((v/v)٪۱)، ترهالوز ((w/v) ۰/۵٪)، CMC((w/v)٪۱)
F_2	گلیسرول ((v/v)٪۱)، ترهالوز ((w/v) ۰/۵٪)، PVP((w/v)٪۲)
F_3	گلیسرول ((v/v)٪۱)، نشاسته ((w/v)٪۱)، PEG((w/v)٪۲)
F_4	ترهالوز ((w/v) ۰/۵٪)، صمغ عربی ((w/v)٪۱)، PEG((w/v)٪۲)
F_5	صمغ عربی ((w/v)٪۱)، نشاسته ((w/v)٪۱)، PEG((w/v)٪۲)
F_6	ترهالوز ((w/v) ۰/۵٪)، نشاسته ((w/v)٪۱)، PVP ((w/v)٪۲)
F_7	گلیسرول ((v/v)٪۱)، ترهالوز ((w/v) ۰/۵٪)، گلوکز ((w/v) ۰/۵٪)، صمغ عربی ((w/v)٪۱)، PEG ((w/v)٪۲)
F_8*	تیمار کنترل با فرمولاسیون آماده و محرمانه
F_9	گلیسرول ((v/v)٪۱)، PEG ((w/v)٪۲)، صمغ عربی ((w/v)٪۱)، گلوکز ((w/v) ۰/۵٪)

* این فرمولاسیون به عنوان تیمار کنترل در این آزمایش استفاده شد.

شمارش باکتری به روش شمارش در کشت نواری درون یک پلیت[6] مطابق شکل ۱ در زمان های ۰ ، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۷۰ و ۳۶۵ روز انجام گرفت، بدین صورت که ۱۰ میلی‌لیتر از زادمایه تهیه شده در شرایط استریل ابتدا در ارلن حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (۹ گرم کلرید سدیم در لیتر) افزوده شد و سری‌های رقت تا رقت 10^{-9} تهیه گردید. سپس سوسپانسون‌های حاصل روی محیط NA[7] کشت شدند و بعد از ۲ روز انکوباسیون در دمای ۲۶ درجه سلسیوس کلنی‌های موجود در پلیت‌ها مشاهده شد و جمعیت باکتری در هر زادمایه تعیین گردید (ساریخانی ۲۰۱۷).



شکل۱- نمونه‌ای از کشت نواری از سری‌های رقت تهیه شده در نمونه مورد آزمایش و رشد کلنی در مسیرهای کشت.

تست جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم

در این تحقیق اثرات مایه تلقیح‌های تهیه شده حاوی باکتری *Enterobacter cloacae* S16-3 بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های بذر گندم در شرایط استریل و به دو روش کشت گلدانی و کشت در پلیت شیشه‌ای بررسی شد. رقم گندم مورد استفاده در این آزمایش رقم بهاره چمران بود.

کشت در پلیت

در روش کشت در پلیت شیشه‌ای، برای هر تیمار ۱۰ عدد بذر در یک پلیت شیشه‌ای حاوی آب آگار در نظر گرفته شد (ساریخانی ۲۰۱۷). در این روش، نمونه‌ها به دور از نور و در دمای مناسب (۲۸-۲۶ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته و پس از ظهور جوانه‌ها، درصد جوانه‌زنی محاسبه گردید. بدین منظور بذور سالم و یکنواخت گندم انتخاب و به منظور ضدعفونی در داخل هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد (وایتکس ۱۰ بار رقیق شده) به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذور ضدعفونی شده در درون هود استریل و در کنار شعله به مدت یک ساعت درون فالکون‌های استریل در ۲ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} تیمارها تلقیح شدند. سپس این

[6] Spread plate count
[7] Nutrient agar

بذور توسط پنس استریل به تعداد ۱۰ عدد در هر پلیت کشت شدند. بعد از کشت از رقت 10^{-1} هر تیمار مقدار ۲ میلی‌لیتر با استفاده از سمپلر در پلیت شیشه‌ای در مجاورت بذور ریخته شد و در اتاقک رشد قرار داده شدند. مقدار آب مقطر استریل مورد نیاز نیز بعد انجام کشت، به هر پلیت افزوده شد. در این مرحله برای حصول اطمینان بیشتر از مایه تلقیح‌های تهیه شده و باکتری، پلیت استریل به عنوان شاهد (بدون تلقیح باکتری) و یک پلیت با تلقیح باکتری (بدون استفاده از مواد حامل) نیز کشت گردید. در طول مدت رشد، مقدار آب مقطر استریل به اندازه مورد نیاز اضافه می‌شد.

کشت گلدانی

کشت گلدانی گیاه گندم در داخل گلدان‌های پلاستیکی کوچک با ماسه استریل و در سه تکرار انجام و در دمای اتاق (۲۸-۲۶ درجه سانتیگراد) زیر نور تکمیلی (نور مهتابی+ نور طبیعی) که به مدت ۱۳ ساعت در روز روشن بودند، به مدت دو هفته نگهداری شدند. در این روش بذور مطابق کشت در ظروف پتری ضدعفونی سطحی گردید. بذور ضدعفونی شده در درون هود استریل و در کنار شعله به مدت یک ساعت درون فالکون‌های استریل در ۲ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} تیمارها تلقیح شدند. سپس این بذور توسط پنس استریل به تعداد سه عدد در هر گلدان کشت گردیدند. بعد از کشت، از رقت 10^{-1} هر تیمار مقدار ۲ میلی‌لیتر با استفاده از سمپلر در هر گلدان در مجاورت هر بذر ریخته شد و در اتاقک رشد قرار داده شدند. مقدار آب مقطر استریل مورد نیاز نیز بعد انجام کشت، به هر گلدان افزوده شد. در این مرحله برای حصول اطمینان بیشتر از مایه تلقیح‌های تهیه شده و باکتری، سه گلدان استریل به عنوان شاهد (بدون تلقیح باکتری) و سه گلدان با تلقیح باکتری (بدون استفاده از مواد حامل) نیز کشت گردید. در کشت گلدانی بعد از گذشت یک هفته، مجدداً در درون هود استریل و در کنار شعله، ۲ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} هر تیمار به هر گلدان افزوده شد. در طول مدت رشد، مقدار آب مقطر استریل به اندازه مورد نیاز اضافه می‌شد. بعد از گذشت دو هفته و جوانه زنی بذور، بوته‌ها توأم با شن‌های اطراف ریشه از گلدان‌ها خارج شده و با احتیاط کامل شستشو شدند. سپس ارتفاع، وزن تر و خشک قسمت هوایی و ریشه محاسبه گردید.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

طرح آزمایشی مورد استفاده در شمارش باکتری به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی(CRD) با در نظر گرفتن سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایش عبارت از: فاکتور اول شامل ۹ ترکیب حامل و فاکتور دوم ۹ زمان شمارش بودند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج کشت گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن سه تکرار و محاسبه ضریب همبستگی و نتایج کشت در پلیت نیز با محاسبه درصد جوانه‌زنی و ضریب همبستگی انجام شد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و رسم نمودار با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

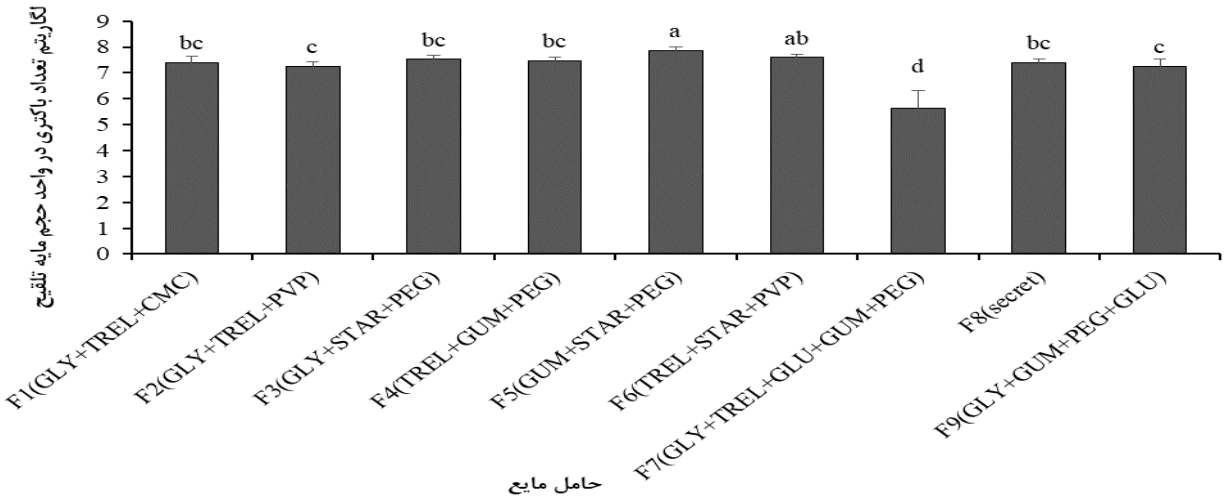
اثر حامل‌ها بر زنده‌مانی باکتری

نتایج حاصل از تجزیه آماری نشان داد که اثر اصلی حامل‌ها بر تعداد باکتری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول۲). شکل ۲ نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد باکتری در حامل‌های مورد آزمایش، دارای اختلاف معنی‌داری با F_8 به عنوان تیمار کنترل می‌باشد. در مدت ۳۶۵ روز، در بین این زادمایه‌های مایع، F_5 و F_6 دارای بیشترین تعداد باکتری در واحد حجم مایه تلقیح در مقایسه با F_8 بوده است. فرمولاسیون F_7 نیز دارای کمترین تعداد باکتری در واحد حجم مایه تلقیح بود.

جدول۲- تجزیه واریانس تعداد باکتری در حامل‌های مایع در زمان‌های شمارش.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
حامل	۸	۱۱/۰۶۳**
زمان	۸	۲۳/۸۵۹**
حامل × زمان	٦٤	٤/۱۸۱**
خطا	۱٦۲	۰/۲۳۹
ضریب تغییرات (٪)	٦/۷۲	

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

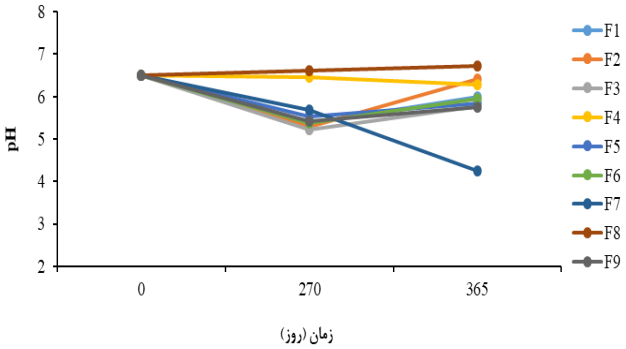


شکل۲- اثر اصلی حامل بر لگاریتم تعداد باکتری در مدت زمان یکسال آزمایش (مواد مورد استفاده در فرمولاسیون حامل‌های مختلف عبارت است از: ترهالوز (TREL)، گلیسرول (GLY)، کربوکسی متیل سلولز (CMC)، پلی وینیل پیرولیدون (PVP)، نشاسته (STAR)، پلی اتیلن گلیکول (PEG)، صمغ عربی (GUM) و گلوکز (GLU).

دلیل برتری مایه تلقیح F_5 که حاوی صمغ عربی، نشاسته و PEG بود را می‌توان به ویژگی‌های مناسب مواد تشکیل‌دهنده آن نسبت داد. پلیمرهای مختلف مانند PEG و صمغ عربی، دارای خواص چسبنده بوده و طبیعت چسبناک آنها می‌تواند روند خشک شدن را کاهش دهد (تمپرانو و همکاران ۲۰۰۲). PEG همانند گلیسرول ویژگی ضدیخی دارد و در دمای پایین از یخ زدن آب جلوگیری می‌کند. صمغ‌عربی مخلوطی از گلیکوپروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها است. ویژگی چسبندگی و تثبیت‌کنندگی آن باعث شده تا در بخش‌های مختلف از آن استفاده شود (خالافالا و دافالا ۲۰۰۸). نشاسته به عنوان ماده افزودنی، چسب و منبع کربن استفاده می‌شود. کاهش سرعت خشک شدن، توانایی نشاسته برای محافظت از سلول‌ها در شرایط تنش خشکی می‌باشد (جان و همکاران ۲۰۱۱). بنابراین بیوپلیمرهایی مانند نشاسته و صمغ عربی دارای توانایی محدود کردن انتقال حرارت و ظرفیت بالای جذب آب می‌باشند (موقنیر و جونگ ۱۹۸۵). این عوامل ممکن است مکانیسمی باشد که بقای باکتری را بهبود ببخشد. مایه تلقیح F_6 نیز از ترهالوز، نشاسته و PVP تهیه گردید. ترهالوز به عنوان یک دی‌ساکارید به طور گسترده برای افزایش تحمل سلول به خشک شدن و تنش دمایی و اسمزی به کار می‌رود (لیپرت و گالینسکی ۱۹۹۲، استریتر ۱۹۸۵). PVP نیز دارای ظرفیت جذب آب

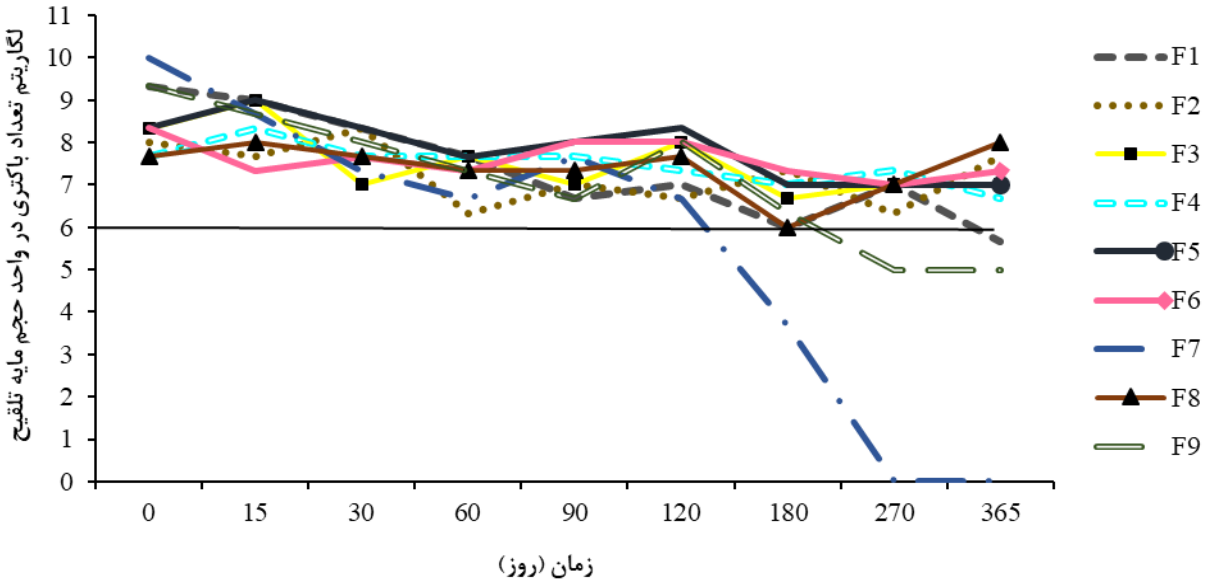
بالایی می‌باشد و احتمالاً مانع از خشک شدن سریع زادمایه می‌شود. سازگاری قوی PVP و قوام چسبندگی آن ممکن است چسبندگی سلول و مایه تلقیح را به بذر افزایش دهد. به طوریکه نقش محافظت‌کننده را ایفا می‌نماید (سینگلتون و همکاران ۲۰۰۲). PVP همانند پلیمرهای PEG و صمغ عربی دارای خواص چسبندگی می‌باشد (تمپرانو و همکاران ۲۰۰۲). نیتا و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که صمغ عربی و PEG از میان مواد بکار رفته، ترهالوز، صمغ عربی، ساکارز، گلیسرول، پلی‌اتیلن‌گلیکول ۳۰۰، اسید آسکوربیک و CMC در فرمولاسیون مایع برای زنده‌مانی *ازتوباکتر دیازوتروفیکوس* و *هرباسپیریلوم سروپدیک* بهترین بودند. تیتابوتر و همکاران (۲۰۰۷) برای افزایش رشد و زنده‌مانی باکتری *برادی‌رایزوبیوم ژاپونیکوم* در فرمولاسیون مایع از مواد افزودنی پلیمری شامل PVP، PEG، PVA، صمغ عربی، نشاسته کاساوا و آلژینات سدیم استفاده کردند. آنان گزارش نمودند که آلژینات سدیم، صمغ عربی، PVP و نشاسته کاساوا بهترین حامل برای فرمولاسیون مایع می‌باشند. مایه تلقیح F_8 را به دلیل اینکه به عنوان برند تجاری تولید می‌شود، در این تحقیق به عنوان تیمار کنترل استفاده شد. شکل ۲ نشان می‌دهد که تیمار F_6 نیز با مایه تلقیح‌های F_1 (گلیسرول، ترهالوز وCMC)، F_3 (گلیسرول، نشاسته و PEG)، F_5، F_4 (ترهالوز، صمغ عربی و PEG) و F_8 اختلاف معنی‌داری ندارد. با توجه به مطالب فوق، خصوصیات مطلوب ترهالوز، نشاسته، صمغ عربی و PEG که سبب افزایش توانایی نگهداری باکتری شده بود، بیان شد. در مورد گلیسرول نیز می‌توان اینگونه بیان کرد که این ماده یک منبع پلی‌اُل ساده و منبع کربن قابل استفاده برای باکتری‌ها می‌باشد. گلیسرول دارای ظرفیت جذب آب بالایی است و حتی به عنوان پوشش بذر نیز عمل می‌کند (ماری و همکاران ۱۹۸۵). CMC نیز به عنوان منبع کربن قابل استفاده می‌باشد. CMC یک استر مشتق شده از سلولز می‌باشد که در نتیجه واکنش سلولز با هیدروکسید سدیم و مونوکلرواستات سدیم تهیه می‌شود. در نتیجه این واکنش، زنجیر طولانی تشکیل می‌شود که به نوبه خود پلیمری هیدروسکوپی و چسبناک و غیرسمی می‌باشد (سانز و همکاران ۲۰۰۵). همچنین CMC ویسکوزیته مایه تلقیح را افزایش می‌دهد و این ویژگی رئولوژیکی ممکن است برای ساختن حامل‌های مناسبی که بتوانند سلول‌های باکتریایی را محافظت کنند، مهم باشد (روهر ۲۰۰۷). فرناندس و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که کاربرد دو ترکیب CMC و نشاسته در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت سبب افزایش زنده‌مانی ریزوبیوم‌ها می‌شود. مایه تلقیح‌های F_2 (گلیسرول، ترهالوز و PVP) و F_9 (گلیسرول، PEG، صمغ عربی و گلوکز) با مایه تلقیح F_8 اختلاف معنی‌دار ندارند ولی مایه تلقیح F_7 اختلاف معنی‌داری با مایه تلقیح F_8 دارد (شکل ۲). علت کاهش زنده‌مانی باکتری در مایه تلقیح F_7 که حاوی گلیسرول، ترهالوز، صمغ عربی، گلوکز و PEG می‌باشد را می‌توان، کاهش pH مایه تلقیح (pH=٤/٢٥) بیان کرد (شکل ۳). با توجه به اینکه *انتروباکتر* نیز تخمیرکننده گلوکز و لاکتوز می‌باشد، بنابراین با مصرف گلوکز سبب تولید و تجمع اسیدهای آلی و کاهش pH محیط گردیده است. کاهش pH به زیر ۵ در طول نگهداری مایه تلقیح به مدت ۳٦۵ روز، می‌تواند دلیلی بر کاهش توانایی نگهداری باکتری در این مایه تلقیح باشد. مقدار pH بقیه مایه تلقیح‌ها نسبت به تیمار F_7، به دلیل استفاده مقدار کمی از ترهالوز و یا گلوکز، بالا بود ولی با این حال از pH=۷ که مناسب برای زندمانی باکتری می‌باشد، پایین‌تر بود. مطالعه پراملا و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که افزایش مقدار گلوکز، منجر به تولید بیشتر اسید لاکتیک می‌شود. از طرفی طبق مطالعاتی که توسط کومبس و ویمپنی (۱۹۸۲) انجام شده، نشان داده شد گلوکز از فاکتورهای مهم در ایجاد نوار رشد می‌باشد. آن‌ها گزارش کردند که هیچکدام از باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد، نوار رشد ایجاد نمی‌کنند ولی در غلظت ۲

درصد و بیشتر (۵ و ۱۰ درصد) همواره نوار رشد ایجاد می‌شود. شاید کاهش pH محیط با گذشت زمان مهمترین دلیل در کاهش زنده‌مانی باکتری در فرمولاسیون F_9 باشد. در واقع دلیل دیگری که می‌توان کاهش جمعیت باکتری در تیمار F_7 با آن توجیه کرد، کمبود مواد غذایی می‌باشد. به نظر می‌رسد کاهش pH محیط با گذشت زمان مهمترین دلیل در افت جمعیت باکتری زنده در فرمولاسیون F_7 می‌باشد.



شکل ۳- روند تغییرات pH در فرمولاسیون‌های مایع در زمان‌های شمارش.

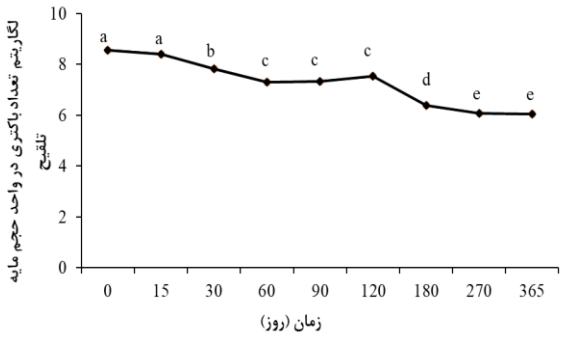
اثر متقابل حامل × زمان بر لگاریتم تعداد باکتری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). شکل ٤ اثر متقابل حامل‌های مایع در زمان را نشان می‌دهد که بعد از دو هفته نگهداری باکتری در دمای اتاق، تعداد باکتری به صورت معنی‌دار نسبت به شمارش زمان اول کاهش یافته است. علت کاهش باکتری در شمارش ۱۵ روز، احتمالاً به علت وارد شدن باکتری در محیط جدید و مواجه با تنش‌های متفاوتی است که از طرف حامل‌های مختلف بر روی جمعیت باکتری وارد شده و باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار بین حامل‌ها گردیده است. نکته قابل تأمل در مورد تمام حامل‌ها، عدم وجود جمعیت اولیه یکسان می‌باشد. این نتیجه در شرایطی حاصل شده است که جمعیت برابری از باکتری به تمام حامل‌ها اضافه شده بود. این نتیجه حاکی از آن است که با افزودن باکتری به برخی از حامل‌ها، به باکتری تنش‌های لحظه‌ای و آنی وارد می‌شود که باعث نوسان جمعیت باکتری می‌شود. نتایج زنده‌مانی باکتری بر روی حامل‌های مایع در شکل ٤ نشان می‌دهد که از میان حامل‌های مایع، حامل‌های F_8، F_2، F_6، F_5، F_3 و F_4 توانستند زنده‌مانی باکتری را در مدت ۳٦٥ روز به ترتیب با لگاریتم جمعیت ۸، ۷/۷، ۷/۳، ۷، ۷ و ٦/۷ جمعیت قابل قبولی از باکتری (بیش از 10^6) حفظ کنند. حامل‌های F_1 تا ۲۷۰ روز با جمعیت ۷ و F_9 تا ۱۸۰ روز با جمعیت ٦/۳ قادر به حفظ زنده‌مانی باکتری بودند. با این همه، حامل‌های F_7 تا ۱۲۰ روز توانسته جمعیت باکتری را بالای 10^6 حفظ کند و بعد از آن کاهش شدیدی یافته به طوری که بعد ۱۸۰ روز، لگاریتم تعداد باکتری در مایه تلقیح به صفر رسیده است که دلیل آن شاید کاهش pH باشد. بقیه حامل‌ها به غیر از F_8 دارای روند یکسانی بودند. دلیل نوسانی که تیمار F_8 در زمان ۱۸۰ روز داشت را شاید بتوان به خطای انجام آزمایش نسبت داد. لازم به ذکر است، حامل‌هایی که جمعیت زنده باکتری را برای مدت کوتاهی حفظ می‌کنند، برای مصرف سریع و فوری و در مواقعی که فاصله محل تولید و مصرف کوتاه باشد، می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.



شکل ۴- روند زنده‌مانی باکتری در حامل‌های مایع در طول زمان (معمولاً جمعیت بالای 10^6 مورد قبول می‌باشد).

اثر زمان بر تعداد باکتری

اثر اصلی زمان بر تعداد باکتری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). شکل ۵ نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد باکتری با زمان، صرف نظر از نوع حامل دارای یک رابطه کاهشی می‌باشد. شاید بتوان گفت که با گذشت زمان عوامل مختلفی از قبیل کمبود عناصر غذایی، تجمع متابولیت‌های بازدارنده، ورود باکتری‌ها به فاز توقف و مرگ رشد، رقابت بین باکتری‌ها و غیره باعث کاهش جمعیت باکتری می‌گردد. اما نکته مهم در معرفی حامل‌های میکروبی، ارائه فرمولاسیونی است که در بازه زمانی طولانی‌تری بتواند جمعیت فعال و زنده میکروبی را حفظ نماید و قادر باشد استانداردهای لازم در زمینه تولید و عرضه کودهای زیستی را تأمین نماید یا فراتر از آن باشد.



شکل۵- اثر زمان بر میانگین لگاریتم تعداد باکتری.

تست جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم کشت در پلیت

نتایج تست جوانه‌زنی در پلیت نشان داد که این زادمایه‌های مایع می‌توانند اثرات مثبتی بر جوانه‌زنی بذر گندم داشته باشند. به طور ۱۰۰ درصد، ده بذر موجود در هر مایه تلقیح به طور همزمان شروع به جوانه‌زنی نمودند. این نکته بیانگر این موضوع است که مواد مورد استفاده در زادمایه‌های میکروبی اثر بازدارنده بر جوانه‌زنی و رشد بذرها نداشته و حتی در برخی موارد باعث ترغیب رشد و بهبود جوانه‌زنی یا رشد آن‌ها شده بودند (جدول ۳).

جدول ۳- درصد جوانه‌زنی در کشت پلیت.

زادمایه‌ها	تعداد بذور رشد یافته	درصد
F_1	۱۰	٪۱۰۰
F_2	۱۰	٪۱۰۰
F_3	۱۰	٪۱۰۰
F_4	۱۰	٪۱۰۰
F_5	۱۰	٪۱۰۰
F_6	۱۰	٪۱۰۰
F_7	۱۰	٪۱۰۰
F_8	۱۰	٪۱۰۰
F_9	۱۰	٪۱۰۰
Control	۱۰	٪۱۰۰
Enterobacter	۱۰	٪۱۰۰

مدت کشت در پلیت یک هفته در نظر گرفته شد.

کشت در گلدان

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از رشد گیاهچه‌های گندم در کشت گلدانی نشان داد که از میان خصوصیات اندازه‌گیری شده، وزن تر ریشه و وزن تر کل به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار گردید و انجام مقایسه میانگین این دو خصوصیت نشان داد که از میان فرمولاسیون‌ها، تیمار F_9 و F_4 در مقایسه با تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری) و F_8 بالاترین مقدار را به خود اختصاص دادند (جدول ٤).

جدول ۴- مقایسه میانگین خصوصیات اندازه‌گیری شده برای کشت گلدانی.

تیمار	وزن تر ریشه ($mg\ pot^{-1}$)	وزن تر کل ($mg\ pot^{-1}$)
F_1	۳۰۰d	۹۰۰c
F_2	٤٤٠cd	۱۰۱۰bc
F_3	٦۱۰bc	۱۲۹۰bc
F_4	۷٤۰ab	۱۳۹۰ab
F_5	۳٥۰cd	۱۰۲۷bc
F_6	٤۷۰bcd	۱۰۳۰bc
F_7	٤٤٠cd	۱۱۲۰bc
F_8	٦۲۰bc	۱۲۱۰bc
F_9	۱۰۲۰a	۱۸۰۰a
Control	۲۸۰d	۹۲۰c
Enterobacter	۲۸۰d	۹٤۰c

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به یافته‌های این آزمایش از میان فرمولاسیون‌های مورد آزمایش، زادمایه F_5 (صمغ عربی، نشاسته و PEG) و F_9 (گلیسرول، گلوکز، صمغ عربی و PEG) در افزایش زنده‌مانی باکتری بهترین نتایج را به همراه داشت. علاوه بر آن نتایج حاکی از آن بود که مواد مورد استفاده در زادمایه‌های میکروبی اثر بازدارنده بر جوانه‌زنی بذرها نداشته و حتی در مواردی باعث ترغیب رشد و بهبود جوانه‌زنی و رشد آن‌ها شد. لازم به ذکر است که این تحقیق فقط توانایی چند ماده حامل را مقایسه کرده است و جهت تکمیل و کاربردی نمودن نتایج حاصل از این آزمایش، پیشنهاد می‌شود برای بررسی اثرات این زادمایه‌ها بر رشد گیاهان، آزمایشاتی در سطح گلخانه و مزرعه انجام گیرد.

منابع مورد استفاده

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

Bazilah AB, Sariah M, Abidin MZ and Yasmeen S, 2011. Effect of carrier and temperature on the viability of *Burkholderia* sp.(UPMB3) and *Pseudomonas* sp.(UPMP3) during storage. International Journal of

Agriculture and Biology 13(2): 198-202.
Coombs J and Wimpenny J, 1982. Growth of *Bacillus cereus* in a gel-stabilized nutrient gradient system. Microbiology 128(12): 3093-3101.
Cakmakci RI, Donmez MF and Erdogan U, 2007. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barely seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. Turkish Journal of Agriculture 31: 189-199.
Cortés-Patiño S and Bonilla RR, 2015. Polymers selection for a liquid inoculant of *Azospirillum brasilense* based on the Arrhenius thermodynamic model. African Journal of Biotechnology 14(33): 2547-2553.
Dayamani K, 2010. Formulization and determination of effectiveness of liquid inoculants of plant growth promoting rhizobacteria. University of Agricultural Sciences GKVK. Bangalore.
Egamberdiyeva D, Juraeva D, Poberejskaya S, Myachina O, Teryuhova P, Seydalieva L and Aliev A, 2004. Improvement of wheat and cotton growth and nutrient uptake by phosphate solubilizing bacteria. Pp. 58-65. In: Jordan D and Caldwell D(eds). 26th Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture. 8-9 June, Raleigh, North Carolina.
Fernandes Júnior PI, Rohr TG, Oliveira PJd, Xavier GR and Rumjanek NG, 2009. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44(9): 1184-1190.
Ghasemi Piranlo F, Sarikhani MR and Najafi N, 2019. Study the survival of *Enterobacter cloacae* bacteria in several solid carriers and effect of prepared inoculants on germination and growth of wheat. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production 29(3): 167-180. (In Persian with English abstract)
Hynes RK, Jans DC, Bremer E, Lupwayi NZ, Rice WA, Clayton GW and Collins MM, 2001. *Rhizobium* population dynamics in the pea rhizosphere of rhizobial inoculant strain applied in different formulations. Canadian Journal of Microbiology 47(7): 595-600.
John RP, Tyagi R, Brar S, Surampalli R and Prévost D, 2011. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. Critical Reviews in Biotechnology 31(3): 211-226.
Khalafalla M and Daffalla H, 2008. In vitro micropropagation and micrografting of gum arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Wild]. International Journal of Sustainable Crop Production 3(1): 19-27.
Lin YC, Chen TL, Ju HL, Chen HS, Wang FD, Yu KW and Liu CY, 2006. Clinical characteristics and risk factors for attributable mortality in *Enterobacter cloacae* bacterium. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 39(1): 67-72.
Lippert K and Galinski EA, 1992. Enzyme stabilization be ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. Applied Microbiology and Biotechnology 37(1): 61-65.
Malusá E, Sas-Paszt L and Ciesielska J, 2012. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. The Scientific World Journal 49(6): 1-12.
Mugnier J and Jung G, 1985. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. Applied and Environmental Microbiology 50(1): 108-114.
Mary P, Ochin D and Tailliez R, 1985. Rates of drying and survival of *Sinorhizobium meliloti* strains during storage at different relative humidities. Applied and Environmental Microbiology 50(2): 207-211.
Moradi SH and Sarikhani MR, 2016. Comparison of dissolution of phosphate from sources of phosphate rock and tricalcium phosphate by some phosphate solubilizing bacteria. Pp. 1-6. Second National Congress for the Development of Science and Natural Resources. 11 May, Gorgan, Iran. (In Persian with English abstract)
Meshram SU and Shend ST, 1982. Response of maize to *Azotobacter chroococcum.* Plant and Soil 69:265-273.
Nita P, Pallavi G, Shubhangi S, Hemlata S, Neha P and Balasaheb K, 2012. Liquid formulations of *Acetobacter diazotrophicus* L1 and *Herbaspirillum seropedicae* J24 and their field trials on wheat. International Journal of Environmental Sciences 3(3): 1116.
Oskuei BK, Bandehagh A, Sarikhani MR and Komatsu S, 2018. Protein profiles underlying the effect of plant growth-promoting rhizobacteria on canola under osmotic stress. Journal of Plant Growth Regulation 37(2): 560-574.
Omer AM, 2010. Bioformulations of *Bacillus* spores for using as biofertilizer. Life Science Journal 7(4): 124-131.
Peng Y He Y, Han Y and Dang Y, 2015. Survability of *Pseudomonas putida* RS-198 in liquid formulations and evaluation its growth-promoting abilities on cotton. The Journal of Animal and Plant Sciences

25(1): 180-189.

Prameela K, Murali MCH and Hemalatha KPJ, 2010. Extraction of pharmaceutically important chitin and carotenoids from shrimp biowaste by microbial fermentation method. Journal of Pharm Research 3: 2393-2395.

Rivera D, Obando M, Barbosa H, Rojas Tapias D and Bonilla Buitrago R, 2014. Evaluation of polymers for the liquid rhizobial formulation and their influence in the *Rhizobium*-cowpea interaction. Universitas Scientiarum 19(3): 265-275.

Rohr T, 2007. Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

Rajabali Jamaat P, Asgharzadeh A, NoohiA, SalehiM, Khavazi K and Akhavan Sepahi A, 2010. The effect of additives in the formulation of biological fertilizers on the germination of cotton seeds. Journal of Microbiological Knowledge 1(3): 41-47. (In Persian with English abstract)

Singleton P, Keyser H and Sande E, 2002. Development and evaluation of liquid inoculants. Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. ACIAR Proceedings 109: 52-66.

Sanz T, Fernandez M, Salvador A, Munoz J and Fiszman S, 2005. Thermogelation properties of methylcellulose (MC) and their effect on a batter formula. Food Hydrocolloids 19(1): 141-147.

Sarikhani MR, 2017. Practical Methods for the Quality Control of Inoculant Biofertilizers. Pp. 58-63, Morteza Dasht Publication, Iran. (In Persian)

Sridhar V, Brahmaprakash GP and Hegde SV, 2004. Development of a liquid inoculant using osmoprotectants for phosphate solubilizing bacterium (*Bacillus megaterium*). Karnataka Journal of Agricultural Sciences 17(2):251-257.

Tittabut P, 2005. Development of rhizobial liquid inoculant production, Thailand. Ph.D. Thesis Biotechnology School of Biotechnology, Suranaree University of Technology.

Tittabutr P, Payakapong W, Teaumroong N, Singleton PW and Boonkerd N, 2007. Growth, survival and field performance of *Bradyrhizobium* liquid inoculant formulations with polymeric additives. Science Asia 33(1): 69-77.

Temprano F, Albareda M, Camacho M, Daza A, Santamaria C and Rodríguez-Navarro ND, 2002. Survival of several *Rhizobium*/*Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. International Microbiology 5(2): 81-86.

Velineni S and Brahmaprakash G, 2011. Survival and phosphate solubilizing ability of *Bacillus megaterium* in liquid inoculants under high temperature and desiccation stress. Journal of Agricultural Science and Technology 13: 795-802.

Xavier IJ, Holloway G and Leggett M, 2004. Development of rhizobial inoculant formulations. Crop Management 3(1): 1-6.