نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۹ شماره ۱صفحه‌های ۲۷ تا ۳۸ / سال ۱۳۹۸

بررسی انحلال فسفات، تحمل دمایی و زنده‌مانی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در کود میکروبی فسفاته

بهمن خوشرو[۱]، محمدرضا ساریخانی[۲]*، ناصر علی اصغرزاد[۳]

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

۲-دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳-استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

باکتری‌هایی با توان انحلال فسفات بالا و مقاوم به دماهای بالا کاندید مناسبی برای استفاده در کودهای میکروبی فسفاته گرانوله می‌باشند. بر این اساس، در این تحقیق کارایی انحلال فسفات، تحمل دمایی و ماندگاری هفت باکتری (*Pantoea agglomerans* P5، *Pseudomonas fluorescens* Tabriz، *P. putida* Tabriz، *Pseudomonas* sp. C16-2O، *Enterobacter* sp. S16-3، *Bacillus megaterium* JK6 و *B. firmus*) پس از تأمین جمعیت میکروبی اولیه مناسب بر بستر پایه خاک فسفات (۴۵ g) + گوگرد (۱۵ g) + باگاس (۳۰ g) مورد ارزیابی قرار گرفت. کود میکروبی تهیه شده به دو قسمت تقسیم شد و تعداد میکروب‌های زنده در آن بعد از گذشت سه و شش ماه به روش شمارش کلنی در پلیت به دست آمد. نیمی از کود در دمای معمولی و نیم دیگر پس از اعمال تیمار دمایی ۵۵ درجه سلسیوس نگهداری شد و سپس میکروب‌های زنده آن شمارش شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین منابع مختلف فسفر از نظر انحلال فسفات وجود داشت و انحلال دو برابری توسط باکتری‌ها از منابع تری‌کلسیم فسفات نسبت به سنگ فسفات به دست آمد. بیشترین و کمترین انحلال فسفات به ترتیب در باکتری *P. agglomerans* P5 (۵۶۲ mg/l) و در گونه *B. firmus* (۳۹۵ mg/l) از منبع تری کلسیم فسفات بدست آمد. هیچ کدام از باکتری‌های مورد استفاده در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته تحمل دمای ۵۵ سلسیوس را نداشتند اما کودهای میکروبی فسفاته ذخیره شده در دمای معمولی بعد از گذشت سه و شش ماه پس از تولید، به طور میانگین جمعیتی برابر با $۴/۳ \times ۱۰^{۵}$ CFU/g و $۰/۴ \times ۱۰^{۴}$ داشتند.

واژه‌های کلیدی: کود میکروبی فسفاته، باکتری‌های حل‌کننده فسفات، *سودوموناس*، تحمل دمایی، زنده‌مانی.

Study of phosphate dissolution, thermal tolerance and viability of phosphate solubilizing bacteria in phosphatic microbial fertilizer

B khoshru[1], MR Sarikhani[*2] and N Aliasgharzad[3]

[1]Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran
[2]Assist. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran
[3]Prof.of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran
* Corresponding author, Email address: rsarikhani@yahoo.com

Abstract
Bacteria with high phosphate solubilization ability and resistant to high temperatures are good candidates for using in phosphatic microbial fertilizers (PMF). Accordingly, in this study the dissolution of phosphate, thermal tolerance and viability of seven PSB (*Pantoea agglomerans* P5, *Pseudomonas fluorescens* Tabriz, *P. putida* Tabriz, *Pseudomonas* sp. C16-2O, *Enterobacter* sp. S16-3, *Bacillus megaterium* JK6 and *B. firmus*) were evaluated in the basal formulation of rock phosphate (45 g), bagasse (30 g) and sulfur (15 g) after providing appropriate initial microbial population. The prepared PMFs was divided into two parts and the number of viable cells was obtained after three and six months by plate count method. The provided PMFs were subjected to microbial counts in two ways. A) Half of fertilizer samples, were stored at room temperature then viable cells counted and B) The other half of PMF were counted after they had been exposed to a temperature of 55 °C for 16 hours. The results showed that there was a significant difference between different phosphorus sources in terms of phosphate dissolution, and dissolution of bacteria from TCP sources compared to rock phosphate was two-fold. The highest and lowest dissolution of phosphate observed in the bacterium *P. agglomerans* (562 mg/l) and *B. firmus* (395 mg/l), respectively. None of the bacteria in PMFs formulations did not tolerate at temperatures up to 55°C, but PMFs that stored at room temperature, after three and six months of production, had an average population of 4.3×10^5, and 0.4×10^4 CFU/g, respectively.

Key Words: Phosphatic microbial fertilizer, Phosphate solubilizing bacteria, *Pseudomonas*, Thermal tolerance, Viability

مقدمه

فسفر به دو شکل آلی و معدنی در خاک‌ها وجود دارد و به‌عنوان یک عنصر غذایی ضروری برای فتوسنتز، انتقال انرژی، بیوسنتز ماکرومولکول‌ها و تنفس گیاهان محسوب می‌شود، اما در اکثر خاک‌های کشاورزی قابلیت دسترسی آن پایین می‌باشد (سلیم پور و همکاران، ۲۰۱۰). غلظت یون فسفر خاک‌ها در محدوده ۰/۱-۱ میکرومولار متغییر است، درحالی‌که نیاز فسفری گیاهان برای رشد بهینه از ۵-۱ میکرومولار (برای گیاهان علفی) و ۶۰-۵ میکرومولار (برای گیاهان با نیاز بالا) تغییر می‌کند (زیدی و همکاران، ۲۰۰۹). عمدتاً برای جبران کمبود فسفر، از کودهای فسفری استفاده می‌شود. کاربرد متوالی این کودها منجر به کاهش حاصلخیزی خاک، کاهش تنوع و فعالیت‌های میکروبی و کاهش عملکرد گیاهان زراعی می‌شود. فرم‌های معدنی فسفر در خاک به‌صورت کانی‌های اولیه‌ای همچون آپاتیت، هیدروکسی آپاتیت و اکسی‌آپاتیت شناخته‌شده و به‌صورت بخشی از سنگ‌های لایه‌ای یافت می‌شوند و مهم‌ترین ویژگی آن‌ها نیز عدم حلالیت‌شان در شرایط قلیایی می‌باشد. با این‌وجود بزرگ‌ترین منابع فسفر خاک را تشکیل می‌دهند (فرناندز و همکاران ۲۰۰۷). به‌طور کلی پدیده تثبیت و رسوب فسفر در خاک‌ها به

دو عامل pH و نوع خاک وابسته است. در خاک‌های اسیدی فسفر توسط اکسیدها و هیدروکسیدهای آهن و آلومینیوم تثبیت می‌شود، درحالی‌که در خاک‌های قلیایی تثبیت در اثر فراوانی کلسیم صورت گرفته و از این طریق باعث کاهش بازده کودهای فسفری مصرف‌شده می‌شود (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۷ ؛ گلدستین ۱۹۹٤).

شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه باکتری‌های خاک توانایی انحلال و تبدیل فسفر نامحلول را به اشکال قابل‌جذب گیاه دارند (خان و جرجسن، ۲۰۰۹؛ حیاتی و همکاران، ۲۰۱۱). مدارک مبنی بر نقش ریزجانداران فراریشه‌ای در انحلال فسفات معدنی به سال ۱۹۰۳ برمی‌گردد (ایلمیر و اسکینر، ۱۹۹۵). استفاده از ریزجانداران خاکزی که توانایی انحلال فسفات‌ها و تبدیل آن به فسفر محلول را دارند، یکی از راه‌های مؤثر برای افزایش قابلیت جذب فسفر در خاک‌ها است (علی اصغرزاد، ۱۹۸۸؛ خوشرو و همکاران، ۲۰۱۵ ؛ قبادی و همکاران، ۲۰۱۳). استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB[1])، سبب صرفه‌جویی ۵۰ درصد در مصرف کودهای فسفری می‌شود بدون اینکه عملکرد گیاهان کاهش یابد (یزدانی وهمکاران، ۲۰۰۹). این دسته از ریزجانداران گرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند، ولی بخشی از آن‌که در محیط آزادشده است مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرد. همچنین فسفر موجود در زیتوده میکروبی که به شکل غیرمتحرک می‌باشد نیز به‌صورت بالقوه قابل‌استفاده برای گیاهان می‌باشد (فاجریا، ۲۰۰۹ ؛ چن و همکاران، ۲۰۰٦ ؛ شکیلا و همکاران، ۲۰۱۷). در گزارش‌های متعددی توانایی گونه‌های مختلفی از باکتری‌ها در انحلال ترکیبات فسفات معدنی نامحلول مانند تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت و سنگ فسفات مورد بررسی قرارگرفته است و در میان باکتری‌ها گونه‌هایی که دارای این توانایی هستند شامل *سودوموناس*، *باسیلوس*، *ریزوبیوم*، *بورخولدریا*، *آکروموباکتر*، *اگروباکتریوم*، *میکروکوکوس*، *آئروباکتر*، *فلاووباکتریوم* و *اروینیا* می‌باشند (سلوی و همکاران، ۲۰۱۷؛ حیاتی و همکاران، ۲۰۱۱). تشخیص ظاهری و حتی تخمین کیفی توانایی انحلال فسفات ریزجانداران با استفاده از روش‌های کشت روی پلیت امکان‌پذیر است. ایجاد هاله اطراف کلنی باکتری در محیط کشت حاوی فسفات نامحلول معدنی (عمدتاً تری‌کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت) به‌عنوان تنها منبع فسفر، بیانگر توانایی ریزجانداران در انحلال ترکیبات معدنی فسفر می‌باشد. تعداد زیادی از ریزجانداران در شرایط درون شیشه[2] توانایی انحلال فسفات نامحلول را نشان داده‌اند (نوبهار و همکاران، ۲۰۱۷ ؛ سایکریتیکا و همکاران ۲۰۱٦ ؛ خوشرو و ساریخانی، ۱۳۹۷). پژوهش‌ها نشان داده است که *ریزوبیوم*، *سودوموناس* و *باسیلوس* از قوی‌ترین حل‌کنندگان فسفات بوده و تری‌کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت از قابلیت حل‌شوندگی بیشتری نسبت به سنگ فسفات برخوردار است (رودریگز و همکاران، ۲۰۰٦). سلطانی و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی ۹۰ نمونه خاک ریزوسفری گندم، تعداد ۲۵ جدایه *Pseudomonas* و ٤٤ جدایه *Flavobacterium* را جداسازی و خالص‌سازی کردند. بنابر این گزارش، توانایی حل‌کنندگی فسفات این جدایه‌ها در محیط کشت اسپربر، با استفاده از منبع تری‌کلسیم فسفات و بعد از

[1] Phosphate-Solubilizing Bacteria

[2] In-vitro

۱۲۰ ساعت از ۱۳۰ تا ۳۸٦ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. همان‌طور که اشاره گردید، شواهد فراوانی دال بر نقش ویژه باکتری‌های حل‌کننده فسفات در افزایش رشد و عملکرد گیاه وجود دارد. با این وجود، هنوز هم پژوهش‌های آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای نتایج کاملاً مثبتی را ارائه نداده‌اند. به‌عنوان‌مثال یک زادمایه از *B. megaterium* واریته فسفاتیکوم در هند و شوروی سابق به‌طور مؤثری استفاده شده است، اما این باکتری همان تأثیر مثبت را در آمریکا نشان نداد (اسمیت و همکاران، ۱۹٦۲). بدون تردید کارایی زادمایه در شرایط خاک‌ها، کشت‌ها و پارامترهای مختلف، متفاوت است. مقدار فسفر خاک نیز احتمالاً یکی از عوامل مهم در تعیین کارایی این محصولات می‌باشد (ساریخانی و همکاران، ۲۰۱٦).

کودهای میکروبی نوعی از کودهای زیستی هستند که در آن بر بستری از مواد آلی- معدنی و شیمیایی از ریزجانداران مفید بهره برده می‌شود. با توجه به اهمیت فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای محصولات کشاورزی، استفاده از کود میکروبی فسفاته مورد توجه است (ضیائیان و همکاران، ۲۰۱۰). در این نوع کود از سنگ فسفات به عنوان منبع تأمین کننده فسفر استفاده می‌شود اما با توجه به پایین بودن میزان انحلال آن، فسفر موجود بایستی از طریق راهکارهای زیستی به فرم محلول درآید. بهره‌گیری از باکتری‌های حل‌کننده فسفات به فرایند انحلال و فراهمی فسفات برای گیاه کمک خواهد نمود (حیدریان و ساریخانی، ۲۰۱۱). کودهای میکروبی فسفاته بر بسترهای آلی و شیمیایی ارزان و در دسترس تهیه می‌شوند که در فرمولاسیون آنها به منظور افزایش اثربخشی از باکتری‌ها و قارچ‌های مفید استفاده می‌نمایند. اما در این میان ماندگاری و توانمندی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مورد استفاده در تهیه این کودها زمینه پژوهش مناسبی است و اطلاعات کمی در این مورد در دسترس می‌باشد. کودهای میکروبی فسفاته بیشتر به صورت گرانوله مورد استفاده قرار می‌گیرند و استفاده از تیمار دمایی نسبتاً بالا یکی از فرایندهای تهیه آن‌ها به شمار می‌رود (خوشرو و ساریخانی، ۱۳۹۷).

ضرورت دستیابی به یک گونه میکروبی کارآمد با زمان ماندگاری بالا و قابلیت کاربرد به‌عنوان کودهای میکروبی فسفاته موضوع این پژوهش است و ضرورت پرداختن به آن احساس می‌شود. علاوه بر آن فرآیند تولید کودهای گرانوله در صنعت مستلزم خشک‌کردن آن در درجه حرارت (٤٠ تا ٥٠ درجه سلسیوس) می‌باشد. لذا لزوم استفاده از باکتری‌هایی که مقاوم به حرارت بوده و یا قابلیت تولید اسپور داشته باشند برای تهیه این کودهای میکروبی حائز اهمیت است و در حال حاضر این نوع از باکتری‌ها کمتر در دسترس می‌باشند، پژوهش‌های اندکی در این زمینه صورت گرفته است، بنابراین در این پژوهش به این جنبه‌ها پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و تهیه کود میکروبی فسفاته

در این پژوهش شش باکتری به نام‌های (*Pseudomonas fluorescens* Tabriz، *P. putida* Tabriz، *Pseudomonas* sp. C16-2O، *Enterobacter* sp. E.S16-3، *Bacillus megaterium* JK6 و *Bacillus firmus*) از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفت. همچنین باکتری *Pantoea agglomerans* P5 به عنوان باکتری حل‌کننده فسفات (مورد استفاده در کود بارور ۲) نیز به عنوان کنترل

مثبت استفاده شد تا مقایسه مطلوبی بین نمونه‌های موجود در بانک میکروبی و نمونه تجاری به عمل آید.

به منظور تهیه کود میکروبی فسفاته پودری برای آزمایش بررسی زنده‌مانی باکتری و تحمل دمایی به شرح زیر انجام شد. برای تهیه بستر اولیه جهت افزودن مایه تلقیح باکتریایی از بستر پایه سنگ فسفات، باگاس و گوگرد استفاده شد. این اجزاء به نسبت ٤٥: ٣٠ : ١٥ استفاده شدند (ضیائیان و همکاران، ۲۰۱۰). پس از اختلاط اجزاء و تأمین رطوبت بهینه برای افزودن باکتری به آن، به صورت زیر عمل شد. پس از اختلاط ترکیب فوق، به ۹۰ گرم از این ترکیب ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد تا رطوبت اولیه تأمین شود، سپس از کشت شبانه باکتری‌های مورد استفاده در آزمایش، یک میلی‌لیتر برداشته (10^8 CFU/ml) و پس از رقیق‌سازی آن با آب به میزان ۱۰ برابر، باکتری به بستر مرطوب افزوده و مخلوط شد، به این صورت جمعیت اولیه در بستر کود میکروبی تقریباً برابر با (10^7 CFU/g) شد (ونگادارامانا و جاشوتان ۲۰۱۲). از کود میکروبی فسفاته پودری حاصل شده برای آزمایشات بعدی استفاده شد. لازم به ذکر است که ابتدا کشت باکتری‌ها در محیط عمومی نظیر NB[1] تهیه شده و پس از قرائت OD[2] و یکسان‌سازی جمعیت باکتری، تلقیح آنها انجام گرفت. کود میکروبی تهیه شده به دو صورت مورد شمارش میکروبی قرار گرفت. الف: نیمی از کود ، با حفظ شرایط اولیه در دمای معمولی نگهداری شد ب: نیم دیگر پس از اعمال تیمار دمایی ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ١٦ ساعت، در زمان‌های صفر، سه و شش ماه تعیین جمعیت شد (خوشرو و ساریخانی ۱۳۹۷).

آزمون نیمه کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

برای انجام این آزمون از محیط کشت Sperber (اسپربر ۱۹۵۸؛ موتسارا و روی ۲۰۰۸) استفاده شد (Glucose 10; Yeast extract 0.5; $CaCl_2$ 0.1; $MgSO_4.7H_2O$ 0.25; $Ca_3(PO_4)_2$ 2.5; Agar 15) که در این محیط به ترتیب از منابع فسفر نامحلول یعنی تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات (با آنالیز: ۱٪ ±۳٦/٥: P_2O_5، ۳/۷±۱٪ Fe_2O_3 :، ٥۰±٤٪ CaO: ۳/٥±۱٪ SiO_2، ۱±۰٪/٥ MgO:، ۰٪/۰٥ SO_3:، ۳±۱٪ F: ۰/۱۸±۰٪/۰۳ CL:، ۱۰±٥ ppm Cd:) از دو معدن مختلف (جنوب و یزد) به عنوان تنها منبع فسفر استفاده شد. برای هر باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته و سطح پتری به سه قسمت مساوی تقسیم شد، مرکز هر قسمت با ٥ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح گردید، ظروف پتری تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه قرار داده شدند. تمامی پلیت‌ها در ٤ نوبت ۳، ٥، ۷ و ۱۲ روز پس از تلقیح از انکوباتور خارج شده و قطر کلنی رشد یافته (Colony diameter) و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات (HD[3]) به دقت اندازه‌گیری شد، متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) در روز دوازدهم برای هر جدایه محاسبه گردید.

آزمون کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

در این مرحله برای بررسی دقیق‌تر میزان حل‌کنندگی فسفات هر باکتری با سه تکرار در محیط کشت اسپربر مایع کشت شد. ابتدا از کشت شبانه باکتری‌ها در محیط نوترینت براث، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت اسپربر مایع تلقیح شد. برای نمونه شاهد بدون تلقیح باکتری نیز ۱۰۰ میکرولیتر نوترینت براث استریل افزوده شد. ارلن‌های

[1] Nutrient Broth
[2] Optical Density
[3] Halo diameter

تلقیح شده در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۸ درجه سلسیوس با شیک ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۱٤٤ ساعت قرار گرفتند. از سوسپانسیون‌های حاصل مقدار دو میلی لیتر برداشته و پس از پنج بار رقیق‌سازی با آب مقطر (حجم نهایی ۱۰ میلی لیتر) در دور ۵۰۰۰rpm، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این مرحله سلول‌های باکتری، ذرات معلق و فسفات نامحلول به کمک سانتریفوژ از سوسپانسیون جمع‌آوری و مقدار فسفر محلول در مایع صاف رویی به روش وانادات – مولیبدات اندازه‌گیری شد (ساریخانی و همکاران، ۲۰۱٦). آزمون انحلال فسفات در حضور هر سه منبع فسفر (تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات از دو معدن مختلف یزد و جنوب) به صورت جداگانه بررسی شد.

شمارش تعداد باکتری و بررسی زنده‌مانی باکتری

با توجه به اینکه تعداد جمعیت میکروبی فعال و زنده در مایه تلقیح میکروبی بایستی منطبق بر استانداردهای حاکم بر محصولات زیستی باشد، بدین منظور برآورد و شمارش میکروبی به عنوان یکی از پارامترهای مهم در کودهای میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور برای مشخص نمودن جمعیت میکروبی، ابتدا سری‌های رقت تهیه شد و از رقت‌های پایانی (رقت 10^{-6}، 10^{-5}، 10^{-4} و 10^{-3}) در ۲ تکرار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط اسپربر جامد انتقال داده شد (موتسارا و روی ۲۰۰۸). شمارش جمعیت در نمونه کودهای میکروبی بلافاصله بعد از تهیه (زمان صفر) و ۳ و ٦ ماه بعد از آن انجام گرفت.

نتایج و بحث

آزمون نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

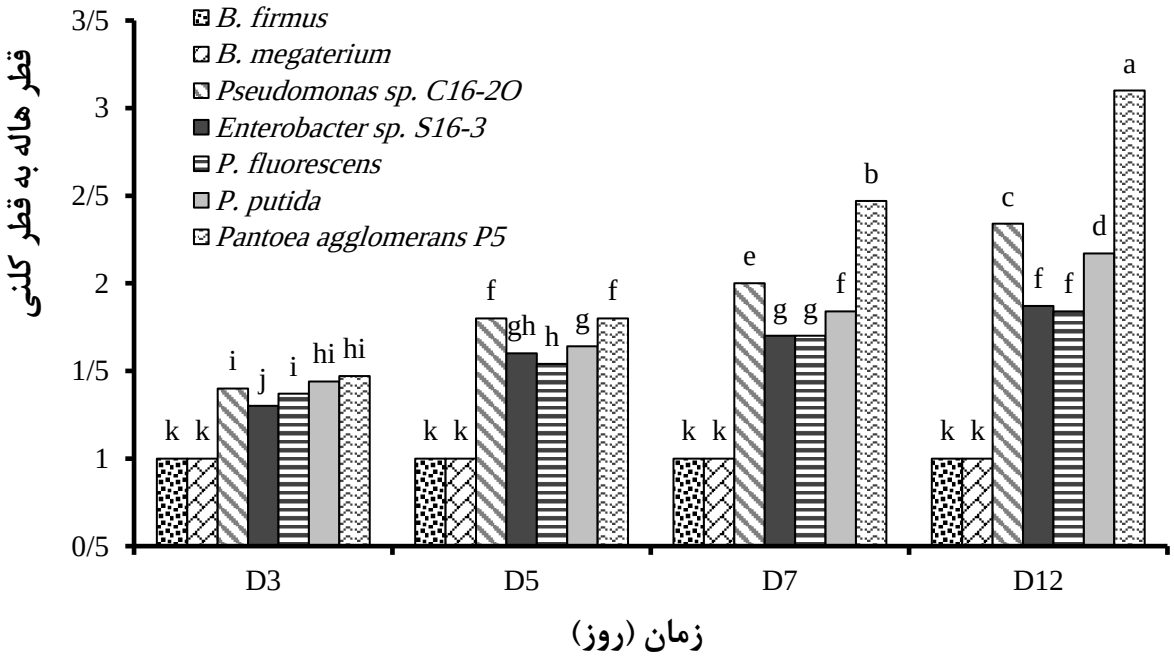
مشاهده هاله شفاف در محیط کشت جامد حاوی فسفر معدنی نامحلول، یکی از روش‌های ارزیابی انحلال فسفات باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین باکتری‌ها از لحاظ قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت (جدول ۱). توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول توسط باکتری‌های مورد استفاده در محیط اسپربر معدنی در حضور منبع تری‌کلسیم فسفات محاسبه گردید (شکل ۱). اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) مشخص کرد که باکتری *P. agglomerans*، *Pseudomonas* sp. C16-2O و *P. putida* Tabriz به ترتیب با دارا بودن مقدار ۳/۱، ۲/۳٤ و ۲/۱۷ برای نسبت (HD/CD) بعد از گذشت ۱۲روز قدرت بالایی در امر انحلال فسفات معدنی نامحلول داشتند و دو باکتری *Enterobacter* sp. S16-3 و *P. fluorescens* Tabriz به ترتیب با دارا بودن نسبت‌های ۱/۸۷ و ۱/۸٤ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. دو باکتری متعلق به جنس باسیلوس یعنی گونه‌های *B. firmus* و *B. megaterium* هیچ هاله‌ای تولید نکردند. در استفاده از اسپربر معدنی با منابع سنگ‌های فسفات هیچ هاله‌ای قابل تشخیص نبود بدین خاطر نتایج آنها آورده نشده است.

در یک مطالعه که برای جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در زمین‌های کشاورزی هند (منطقه اوتاراکند) صورت گرفت، از ۸ ایزوله رشد کرده در محیط جامد Pikovskaya حاوی تری‌کلسیم‌فسفات، ۳ جدایه دارای نسبت HD/CD بالای ٤ بودند و بالاترین میزان حل‌کنندگی فسفر در روش کمی نیز در بین این جدایه‌ها ۳۰۵/٤۹µg/ml بود (پاندە و همکاران، ۲۰۱۷).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر باکتری‌ها در انحلال نیمه کمی فسفات معدنی نامحلول

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۶	۲/۳۷**
زمان	۳	۱/۴۵**
باکتری × زمان	۱۸	۰/۱۸۶**
خطا	۵۴	۰/۰۰۵

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد (P<۰/۰۱)



شکل ۱- توان حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش نیمه‌کمی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات مورد استفاده در کودهای میکروبی فسفاته

توجه به قطر هاله شفاف در مورد باکتری‌های حل‌کننده فسفات در گزینش این باکتری‌ها در اغلب منابع آورده شده است همانطورکه در شیوه‌نامه ثبت مواد کودی موسسه تحقیقات خاک و آب (بی‌نام، ۲۰۱۵) برای باکتری‌های حل‌کننده فسفات، حداقل نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی معادل ۱/۵ ذکر شده است و با توجه به آن به غیر از دو باکتری *B. firmus* و *B. megaterium*، بقیه باکتری‌ها که دارای نسبت بالاتر از ۱/۵ بودند قابلیت استفاده شدن در کودهای میکروبی فسفاته را دارا می‌باشند. با توجه به اینکه در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته از سنگ فسفات بهره برده می‌شود لذا در استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات علاوه بر لحاظ نمودن ماندگاری باکتری در چنین بستری، باید بیشتر به باکتری‌هایی توجه شود که از منابع سنگ فسفات، فسفر بیشتری را محلول می‌سازد.

آزمون کمی قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

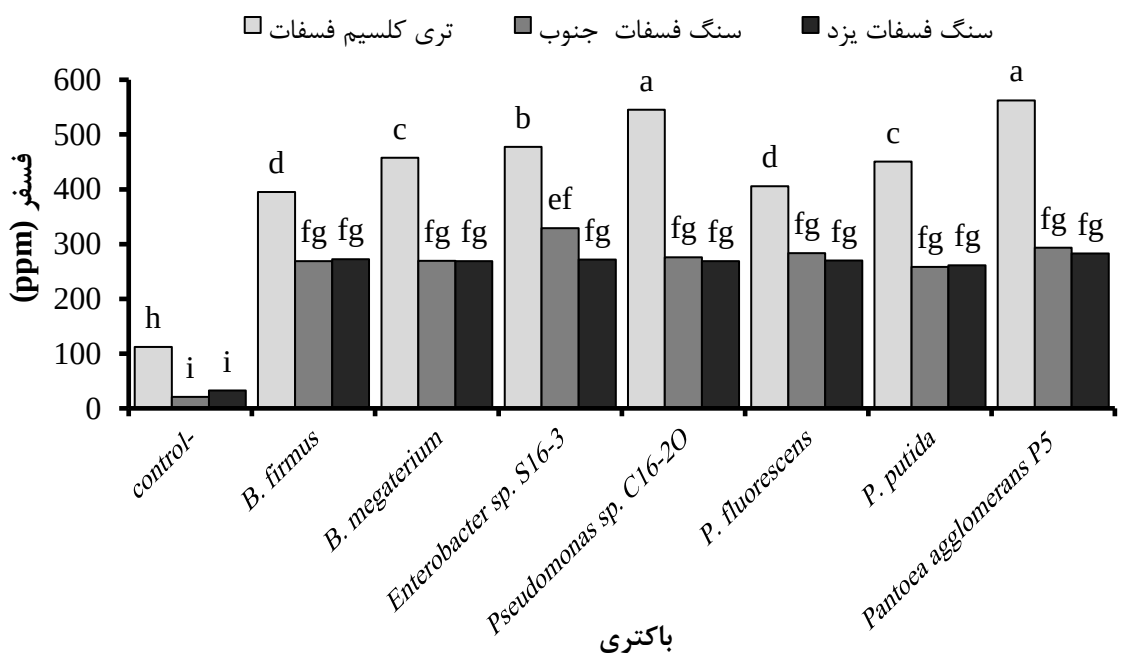
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین باکتری‌های مورد

استفاده در کودهای میکروبی از لحاظ قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول در محیط اسپربر مایع تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت (جدول ۲). در حضور تری‌کلسیم‌فسفات، باکتری‌های *P. agglomerans*، *Pseudomonas* sp. C16-2O و Enterobacter sp. S16-3 به ترتیب با دارا بودن مقدار ۵۶۲، ۵۴۵ و ۴۷۸ میلی گرم بر لیتر بیشترین میزان حل‌کنندگی را از خود نشان دادند (شکل ۲). کمترین انحلال فسفات به روش کمی نیز همانند روش کیفی مربوط به دو گونه *B. firmus* و *B. megaterium* بود. در بین باکتری‌ها به جز سویه S16-3 تفاوت معنی‌داری از نظر انحلال فسفر از منابع سنگ فسفات دیده نشد و همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند، اما همه باکتری‌ها با تیمار شاهد بدون تلقیح باکتری اختلاف معنی‌دار داشتند. علاوه بر آن نتایج حاکی از آن بود که انحلال فسفات از منبع تری‌کلسیم فسفات بیشتر از منابع سنگ فسفات بود. بر اساس شکل ۳ همه باکتری‌ها از نظر انحلال فسفات از دو منبع سنگ فسفات رفتار مشابهی داشتند اما *Enterobacter* sp. S16-3 مقادیر بالاتری را نشان داد هرچند به لحاظ آماری با بقیه باکتری‌ها در یک گروه آماری قرار گرفت.

جدول۲- تجزیه واریانس اثر باکتری‌ها در انحلال کمی فسفات معدنی نامحلول

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	٦	۱۱۵۳۲۹**
منبع فسفر	۲	۱۹٦٦۳۳**
باکتری × منبع فسفر	۱۲	۷٦۷۵**
خطا	٤۰	۲۹۵

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد (P<۰/۰۱)



شکل ۲- میزان انحلال فسفات توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات مورد استفاده در کودهای میکروبی فسفاته از سه منبع فسفر نامحلول

گزارشات متعددی وجود دارد که توانایی سویه‌های مختلف باکتریایی را برای انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول همچون تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، دی هیدروکسی آپاتیت و خاک فسفات نشان می‌دهد (متیوس و ازدهار، ۲۰۱٦). در پژوهشی ۱۳ باکتری جدا شده از ٤ نوع کود زیستی رایج ایران شامل بارور۲، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین مورد بررسی قرار گرفت و جدایه‌های مورد استفاده در آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی از نظر انحلال فسفات معدنی به روش کیفی و کمی ارزیابی شدند. در ویژگی انحلال فسفات معدنی از منبع تری‌کلسیم فسفات به دو روش کیفی و کمی، جدایه Ba1 از بارور ۲ با ایجاد بیشترین نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی (۳/۲) و انحلال فسفات به مقدار ٦۰٦ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین توان انحلال فسفر بود. توان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های ذکر شده به روش کمی در محدوده ۷۷/۱۵- ٦۰٦ میلی گرم بر لیتر بود (خوشرو و همکاران، ۱۳۹٤). بررسی وجود همبستگی بین روش نیمه‌کمی (نسبت قطر هاله به قطر کلنی) و روش کمی (انحلال فسفات در محیط اسپربر مایع) نشان داد (جدول ۳) که همبستگی معنی‌داری بین این دو وجود دارد (r=۰/۷۷). همان‌گونه که بالاترین نسبت در روش کیفی مربوط به *P. agglomerans* و *Pseudomonas* sp. C16-2O بود بیشترین انحلال فسفات در محیط مایع (TCP) نیز برای همین گونه‌ها به دست آمد.

جدول۳- ضرایب همبستگی ساده پیرسون بین روش کمی و کیفی انحلال فسفات

تری کلسیم فسفات (روش مایع)	روز۳	روز ٥	روز ۷	روز ۱۲
تری کلسیم فسفات (روش مایع)	۱	۰/٥٤۳	۰/٦۷۸	۰/۷٥۰	۰/۷۷٦*

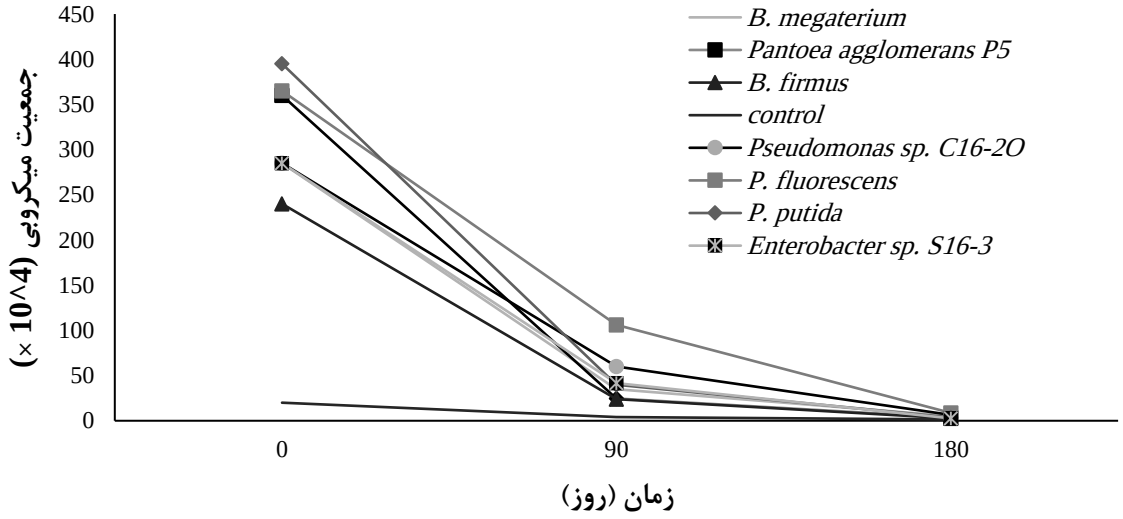
* معنی‌دار در سطح ٥ درصد

شمارش و بررسی زنده‌مانی جمعیت فعال کودهای زیستی

در بررسی تعداد جمعیت میکروبی فعال و نیز زنده‌مانی باکتری‌ها در دمای معمولی در زمان‌های صفر، سه و شش ماه پس از تلقیح (جدول ٤) در محیط اسپربر، جدول تجزیه واریانس نشان داد که زنده‌مانی باکتری‌های به‌کاررفته در کودهای میکروبی متأثر از زمان‌های مورد نظر می‌باشد. در شمارش جمعیت میکروبی اولیه (زمان صفر) همه باکتری‌های به‌کاررفته در بسترهای میکروبی دارای جمعیت قابل قبولی بودند و در بررسی تعداد جمعیت میکروبی در بستر اولیه، باکتری‌های *P. putida*، *P. fluorescens*، *P. agglomerans*، *Enterobacter* sp. S16-3، *Pseudomonas* sp. C16-2O، *B. megaterium*، *B. firmus* به ترتیب با جمعیت‌های ($\times۱۰^{٦}$) ۳/۹٥، ۳/٦٥، ۳/٦، ۲/۸٥، ۲/۸٥، ۲/۸٥، ۲/٤ مورد شمارش قرار گرفتند. شمارش باکتری‌ها در سه ماه بعد از تلقیح، یک افت شدید نمایی در جمعیت باکتری‌ها را نشان داد (شکل ۳). نتایج بخش تیمار دمایی کودهای میکروبی فسفاته نشان داد که هیچ کدام از باکتری‌های به‌کاررفته در کودها در اثر تیمار دمایی زنده نمی‌مانند.

بر اساس استانداردهای تعریف شده برای کودهای میکروبی فسفاته گرانوله در شیوه‌نامه کودهای زیستی (بی‌نام ۲۰۱٥)، جمعیت میکروبی حل‌کننده فسفات بایستی دارای ماندگاری ۹ ماهه باشد و جمعیت حداقل ۱×۱۰^{٥} به ازاء هر گرم کود باشد. این پژوهش هرچند در

شرایط پودری و با میزان رطوبت بیشتری دنبال شد و هدف ارزیابی ماندگاری جمعیت میکروبی در شرایط تقریباً مشابه بود، لیکن هیچ یک از باکتری‌ها توان ماندگاری طولانی مدت در چنین بستری را نداشتند و به دلیل افت جمعیت بعد از گذشت شش ماه از ادامه آزمایش و شمارش در نه ماه اجتناب شد.



شکل ۳- زنده‌مانی جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات در کودهای میکروبی فسفاته

جدول۴- تجزیه واریانس زنده‌مانی باکتری‌ها در کودهای میکروبی فسفاته در طول زمان

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۷	۱۳۰**
زمان	۲	٤۳۲٦**
باکتری * زمان	١٤	۷۸**
خطا	۲٤	۳/٤۱

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد (P<۰/۰۱)

خوشرو و ساریخانی (۱۳۹۷) گزارش کردند که از یازده باکتری جداشده از خاک، پنج باکتری قادر به انحلال فسفات کم محلول تری کلسیم فسفات بودند و از میان این پنج باکتری حل‌کننده فسفات تنها دو باکتری قادر به تحمل دمای ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ١٦ ساعت شدند.

نتیجه‌گیری

این آزمایش با هدف بررسی توانایی باکتری‌های به‌کاررفته در کودهای میکروبی از نظر انحلال فسفر کم محلول (به صورت نیمه‌کمی و کمی) در سه محیط کشت با منابع مختلف فسفر، شمارش جمعیت میکروبی و بررسی زنده‌مانی باکتری‌ها در مدت زمان صفر، سه و شش ماه بعد از تلقیح باکتری‌ها در بسترهای تولید شده، انجام گرفت. نتایج بررسی‌های آزمایش انحلال فسفر کم‌محلول در شرایط نیمه‌کمی و کمی و در محیط اسپربر نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین منابع مختلف فسفر از نظر انحلال توسط باکتری‌ها وجود داشت و نتیجه به صورت انحلال بیشتر فسفر به ترتیب از منابع تری‌کلسیم فسفات، سنگ فسفات جنوب و سنگ فسفات یزد بود. نتایج بررسی انحلال فسفات به روش کمی و به روش نیمه‌کمی در حضور منبع تری‌کلسیم فسفات دارای همبستگی خوبی بودند. به‌طوری‌که در هر دو آزمایش باکتری‌های *P. agglomerans*، *Pseudomonas*

sp. C16-2O، *P. putida* و *Enterobacter* sp. S16-3 و *P. fluorescens* از نظر انحلال فسفر دارای مقادیر بالایی نسبت به تیمار کنترل (شاهد) بودند. تفاوت بارز بین دو آزمایش کمی و نیمه‌کمی فسفر در باکتری *B. megaterium* مشاهده شد، این باکتری با وجود اینکه در آزمایش کمی دارای انحلال قابل قبول فسفر بود ولی در شرایط نیمه‌کمی قادر به تشکیل هاله شفاف نبود. نتایج بررسی زنده‌مانی باکتری‌ها در بستر کودهای میکروبی حاکی از وجود جمعیت میکروبی (۱۰۰×) تا سه ماه بعد از تولید بود. ولی بایستی توجه کرد که یک کاهش نمایی در جمعیت باکتری‌های کود میکروبی بعد از گذشت سه ماه مشاهده شد که می‌تواند از پتانسیل کود میکروبی از نظر ویژگی‌های PGPRای به شدت بکاهد، لذا در مصرف این نوع کودها به زمان بایستی توجه بیشتری نمود.

منابع مورد استفاده

Aliasgharzad, N. 1997. Soil Microbiology and Biochemistry (Farsi translation). First Edition. Tabriz University Press. Iran.

Anonymous, 2015. Protocols for registration of fertilizers material. Institute of Soil and Water Research. Karaj, Iran.

Chen YP, Rekha Arun PD, Shen AB, Lai FT, and Young WA, 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology 34: 33–41.

Fernandez LA, Zalba P, Gomez MA, and Sagardoy MA, 2007. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. Biology and Fertility of Soil 43: 805–809.

Ghobady M, Jahanbin S, Owliaie HR, Motalebifard R and Parvizi K. 2013. The effect of phosphorus biofertilizers on yield and phosphorus uptake in potato. Journal of Water and Soil Science 23(2): 126-138. (In persian)

Goldstein AH, 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. Pp. 197-203. In: Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S. (eds.). Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular biology. Washington, DC: ASM Press.

Hayati M, Gholizadeh A, Fallah AR and Rezvani M. 2011. Effects of Bacillus coagulans and different sources of phosphate rocks on canola (Brassica napus L.) Journal of Water and Soil Science 21(1): 128-136. (In persian)

Heydarian Z and Sarikhani MR, 2011. Growth promoting bacteria (PGPR) a promising approach to sustainable agriculture. 1th Specialized Conference on Strategies for Achieving Sustainable Agriculture. 5-6th of June. Ahvaz. Iran. (In persian)

Illmer P, and Schinner F, 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates. Soil Biology and Biochemistry 46: 257-263.

Khan KS and Jorgensen RG, 2009. Changes in microbial biomass and P fractions in biogenic household waste compost amended with inorganic P fertilizers. Bioresource Technology 100: 303-309.

Khoshru B and Sarikhani MR. 2018. Isolation of temperature resistant phosphate solubilizing bacteria for use in phosphatic microbial fertilizer. Journal of Soil and Water 32(1): 155-167.

Khoshru B, Sarikhani MR and Aliasgharzad N. 2015. Molecular and biochemical identification of the bacterial isolates used in common biofertilizers in Iran. Journal of Water and Soil Science 25(4.2): 13-26. (In persian)

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

Matthews S and Adzahar MS. 2016. Application of phosphate solubilizing microorganisms to increase the solubilization of rock phosphates in soil. Journal of Tropical Agriculture and Food Science 44(1): 9-18.

Motsara MR and Roy RN, 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis (Vol. 19). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

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

Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M and Kaushik S, 2017. Phenotypic and Genotypic Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Efficiency on the Growth of Maize (Zea mays), International Journal of Agriculture Innovations and Research 5: 929-938

Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez T and Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth promoting bacteria. Plant and Soil 287: 15-21.

Saikrithika S, Krishnaswamy VG and Sujatha B. 2016. A study on isolation of phosphate solubilizing bacterial (PSB) strain from vermicomposted soil and their phosphate solubilizing abilities. International Journal of Advanced Biotechnology and Research 7(2): 526-535.

Salimpur S, Khvazi K, Nadian H and Miransari M. 2010. Enhancing phosphorous availability to canola (Brassica napus L.) Using P solubilizing and sulfur oxiding bacteria. Australian Journal of Crop Science 4(5):330-334.

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.

Selvi KB, Paul JJA, Vijaya V and Saraswathi K, 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. Biochemistry and Molecular Biology Journal 3 (1).

Shakeela S, Padder SA and Bhat, ZA, 2017. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with medicinal plant Picrorhiza Kurroa. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 6(3): 157-168

Smith JH, Alison FE, and Soulides DA, 1962. Phosphobacteria as a soil inoculant. Technology Bulletin of the US Department of Agriculture 1: 63-70.

Soltani Tolarod EA, Salehrastin N, Khavazi K, Asadi Rahmani H and Abbaszadeh P, 2008. Separating and study of plant growth promoting (PGP) in some Pseudomonas fluorescent native Iranian soil. Journal of Soil and Water Sciences 21(2): 278.

Sperber JI, 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research 9: 782-787.

Vengadaramana A, and Jashothan PTJ, 2012. Effects of organic fertilizers on the water holding capacity of soil in different terrains of Jaffna peninsula in Sri Lanka. Journal of Natural Product and Plant Resources 2(4): 500-503.

Yazdani M, Bahmanyar MA, Pirdashti H, and Esmaili MA, 2009. Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and components of corn (Zea mays L.). World Academy of Science, Engineering and Technology 37: 90-92.

Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, Wani PA, 2009. Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes. Microbial Strategies for Crop Improvement. pp: 23- 50.

Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, and Wani PA, 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In Microbial Strategies for Crop Improvement Springer, Berlin, Heidelberg pp. 23-50.

Zhang J, Wang P, Fang L, Zhang QA, Yan C and Chen J, 2017. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. Polish Journal of Microbiology 66(1): 57-65.

Ziaeyan A, Salim-pour S, Silsipour M and Safari H, 2010. Evaluation of some chemical and biological fertilizers of phosphorus on corn. 1th congress on fertilizer challenges in Iran: half a century of fertilizer use. 10-12 March, Tehran, Iran. (In persian)