نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۶، ص. ۲۶۲-۲۵۴

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 1, Mar.-Apr. 2017, p. 254-262

بررسی قابلیت ماندگاری باکتری‌های حل‌کننده فسفات در گرانول فسفاته

هاجر رجبی‌هشجین[۱]– علیرضا فلاح[۲*]– غلامرضا بخشی‌خانیکی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۶

چکیده

توسعه پایدار و حفظ محیط‌زیست ارتباط تنگاتنگی باهم دارند. کشاورزی پایدار، تولید و بهره‌برداری مداوم از یک زیست‌بوم زراعی با رعایت جنبه‌های مختلف زیست‌محیطی بر اساس به‌کارگیری حداقل نهاده‌ها (غیر از کود آلی) است. فسفر یکی از عناصر مهم و ضروری برای گیاهان است. برای تأمین فسفر موردنیاز از کودهای فسفره استفاده می‌شود که در شرایط خاک، به‌صورت نامحلول درآمده و از دسترس گیاه خارج می‌شود. کودهای زیستی حاوی میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات باعث حل شدن فسفر نامحلول و کاهش مصرف کودهای شیمیایی می‌گردد. به‌منظور بررسی قابلیت ماندگاری باکتری‌های حل‌کننده فسفات در گرانول آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰ ایزوله انتخاب شدند و به ترتیب با نسبت ۵۰، ۲۵، ۱۵ و ۱۰ درصد از آپاتیت، ماده آلی، گوگرد و محلول گرانول ساز (نسبت ۱:۱ و ۲:۱ باکتری و ملاس چغندرقند) برای هر ایزوله تهیه شد. محصول نهایی در دمای ۲۸ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و ۴ ماه نگهداری شد و شمارش جمعیت بلافاصله و در ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز بعد به روش سری‌های رقت انجام گرفت. بیشترین جمعیت باکتری در نسبت ۱:۱ مایه تلقیح به ملاس چغندرقند مشاهده شد البته برخی از باکتری‌ها توانستند در نسبت ۲:۱ نیز جمعیت خود را تا مدتی حفظ کنند. گرانول تولیدشده بر اساس استاندارد تعریف‌شده تا ۳ ماه جمعیت خود را حفظ کرد و مناسب‌ترین جمعیت در گرانول ۱:۱ خشک‌شده در ۲۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و برخی از گرانول‌های نسبت ۱:۱ دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نیز با استاندارد تعریف‌شده مطابقت داشتند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده، فسفر، درجه حرارت، کود زیستی، گرانول، ملاس چغندرقند

مقدمه

بدون خاک، زندگی انسان و بسیاری از شکل‌های زندگی روی کره زمین ناممکن به نظر می‌رسد. این همان باوری است که سبب تدوین لایحه جامع خاک (پیش‌نویس جامع خاک) در کشور شده است. ازاین‌رو برای تأمین غذا، برای جمعیت رو به افزایش و همچنین در راستای بالا بردن استاندارد برای برخی جوامع کنونی که در شرایط تغذیه ناکافی به سر می‌برند، باید تولید مواد غذایی افزایش یابد. این افزایش تولید، باید از همین زمین‌هایی باشد که در حال حاضر زیر کشت هستند. خاک به‌عنوان منبع طبیعی تجدید ناپذیر در حال تخریب است که این فرایند نهایتاً به کاهش تولیدات کشاورزی منجر شده است. توسعه سریع صنعتی و کشاورزی و بهره‌گیری از مواد شیمیایی متنوع و همچنینی مصرف زیاد کودهای شیمیایی، عوامل بالقوه‌ای برای آلوده کردن خاک و آب فراهم ساخته است. آلودگی خاک به‌واسطه استفاده از کودهای شیمیایی در ایران بیشتر مربوط به مصرف بی‌رویه و نا به‌جای آن است.

کودهای شیمیایی یکی از عوامل اصلی حفظ حاصلخیزی خاک می‌باشند ولی استفاده بیش‌ازاندازه از آن‌ها به‌ویژه هنگامی‌که با عملیات مدیریتی نامناسب مثل سوزاندن بقایای گیاهی همراه شود، میزان ماده آلی خاک را به‌شدت کاهش می‌دهد. این موضوع روی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک تأثیر گذاشته و امکان فرسایش را در این خاک‌ها افزایش می‌دهد (۵ و ۱۴). امروزه به دلیل افزایش اهمیت مسائل زیست‌محیطی توجه بیشتری به کودهای زیستی یا زیستی برای جایگزینی کودهای شیمیایی شده است (۱۳). درواقع کودهای زیستی به مواد حاصلخیز کننده‌ای گفته می‌شود که حاوی تعداد کافی از یک یا چندگونه از موجودات مفید خاکزی هستند که روی مواد نگه‌دارنده مناسبی عرضه می‌شوند (۷). عرضه مواد

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، مرکز تهران شرق
۲- دانشیارموسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email:Rezafayah@ yahoo.com
۳- استاد گروه علوم کشاورزی (بیوتکنولوژی) دانشگاه پیام‌نور
DOI: 10.22067/jsw.v31i1.52420

آلی به خاک، به دلیل پاسخگویی به یکی از بزرگ‌ترین نیازهای گیاه از مزایای بارز این قبیل کودهاست. علاوه بر این، تأمین عناصر غذایی به صورتی کاملاً متناسب با تغذیه طبیعی گیاهان، کمک به تنوع زیستی، تشدید فعالیت‌های حیاتی، بهبود کیفیت و حفظ سلامت محیط‌زیست از مهم‌ترین مزیت‌های کودهای زیستی به شمار می‌رود (۲۳). برطرف کردن کمبود فسفات به‌وسیله کاربرد کودهای شیمیایی فسفات پرخطر و گران، چاره‌ای مطلوب و ایده آلنیست و پیامدهای جدی برای عملیات کشاورزی بعدی ایجاد می‌کند. مقادیر زیادی از کودهای شیمیایی برای تأمین فسفر و نیتروژن خاک استفاده می‌شوند که آلودگی‌های محیطی شدیدی را به وجود می‌آورند (۱ و ۴). بخش زیادی از فسفر غیر آلی که به‌صورت کودهای شیمیایی به‌کاربرده می‌شود به‌سرعت تثبیت‌شده و به فرم غیرقابل‌دسترس و غیرقابل‌حل برای گیاه تبدیل می‌شود (۱۲). مقدار مصرف کودهای فسفره در کشور حدود ۷۰۰ هزار تن است که بخش اندکی از آن در داخل و سالیانه حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ هزار تن از این محصول شیمیایی از خارج وارد می‌گردد (۱۸). این در حالی است که سالانه بین ۷۵ الی ۹۰ درصد فسفر اضافه‌شده به خاک به دلیل آهکی بودن اکثر خاک‌ها، وجود pH بالا، تنش خشکی و وجود بی‌کربنات در آب آبیاری و کمبود مواد آلی موجود در خاک و همچنین در اثر ترکیب با یون‌های کلسیم، آلومینیوم و آهن در خاک به‌صورت رسوب درمی‌آید و از دسترس گیاه خارج می‌شود (۱۲ و ۲۷). هدف کشاورزی پایدار توسعه کاربرد کودهای زیستی است؛ برای نیل به این هدف محدود کردن کاربرد کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها در هر زمانی ضروری است (۲۱). استفاده از کودهای زیستی ازجمله کودهای حاوی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در راستای کشاورزی پایدار ضمن کاهش مصرف کودهای شیمیایی و افزایش برداشت محصولات کشاورزی به جلوگیری از آلودگی و حفظ محیط‌زیست کمک می‌کند (۱۱، ۱۹ و ۲۴). استفاده از ریز جانداران خاک‌زی به‌منظور افزایش رشد و تولید گیاهان از اوایل قرن بیستم میلادی ابتدا در آمریکا و روسیه و سپس در کشورهای دیگر آغاز شد ولی به دلیل اثر سریع و آنی کودهای شیمیایی، سهولت در کاربرد و قیمت ارزان آن‌ها، کودهای زیستی مورداستفاده قرار نگرفتند و برای مدت زیادی به بوته فراموشی سپرده شدند. در سی سال اخیر به دلیل آشکار شدن اثرات سوءمصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی و قیمت رو به تزاید آن‌ها مجدداً استفاده از کودهای زیستی در کشاورزی مطرح‌شده است. مطالعات زیادی بر روی امکان استفاده از کودهای زیستی بر روی محصولات متعدد به‌عمل‌آمده است (۲، ۶،۱۷، ۲۱، ۲۲، ۲۵، ۲۶ و ۲۹). نتایج تحقیقات نشان داده است که میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات قادرند در منطقه ریزوسفر فعالیت نموده و با کمک ترشحات ریشه،ترکیبات نامحلول فسفات مانند تری کلسیم فسفات را به‌صورت محلول و قابل‌جذب گیاه درآورند (۱۶). قارچ‌های میکوریزی و باکتری‌های حل‌کننده فسفات مناسب‌ترین جایگزین کودهای شیمیایی و سازگارترین کودهای زیستیبا محیط‌زیست در کشاورزی پایدار می‌باشند که به دلیل اثرات جداگانه و متقابل روی یکدیگر و گیاهان میزبان، موردتوجه بسیاری از محققین قرارگرفته‌اند (۸ و ۹). استفاده از کودهای زیستی باعرضه کودهای میکروبی در اوایل دهه ۱۹۷۰ شروع شد. در اوایل دهه ۱۹۸۰ کاربرد کودهای زیستی در زراعت محصولات مختلف اهمیت پیدا کرد. کودهایمیکروبی ازجمله IARImicrophos در هند (۱۵)، Phosphobacteria در روسیه و اروپای شرقی مورداستفاده قرار گرفتند.

هدف از پژوهش حاضر بررسی قابلیت ماندگاری باکتری‌های حل‌کننده فسفات در گرانول هست. نتایج این آزمایش می‌تواند منجر به تولید گرانول فسفره شود و متعاقباً مصرف کودهای شیمیایی فسفره و همچنین اثرات زیان‌بار مصرف بیش‌ازحد کودهای شیمیایی را کاهش داده و به حفظ محیط‌زیست و منابع در دسترس کمک کند.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با هدف بررسی قابلیت ماندگاری باکتری‌های حل‌کننده فسفات در گرانول صورت گرفت. این پژوهش آزمایشگاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل انجام گرفت؛ و قابلیت ماندگاری ۱۰ایزوله (B_{3-2},B_{4-2},C_{5-1},I_{2-4} ,P_6 ,P_{15} ,P_{21} ,Z_4 ,P_{39-1}) از باکتری‌های حل‌کننده فسفات مورد بررسی قرار گرفت، که بعد از نمونه‌گیری از منطقه ریزوسفری گیاه به روش شمارش با تهیه سری‌های رقت[1] و کشت بر روی محیط اسپربر و مشاهده هاله روشن اطراف کلنی‌ها که ناشی از حلالیت فسفات بود شناسایی شدند. ابتدا از آپاتیت (خاک فسفات)، ماده آلی و گوگرد با توجه به نسبت تعیین‌شده به ترتیب ۵۰، ۲۵ و ۱۵ درصد ترکیب و به مقدار مشخص توزین شد. مایه تلقیح برای هر ایزوله تهیه و (تلقیح محیط نوترینت براث با اضافه کردن یک لوپ از کلونی‌های رشد کرده در محیط اسپربر انجام و ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شد) مایع گرانول‌ساز با نسبت‌های ۱:۱ و ۲:۱ مایه تلقیح باکتری به ملاس چغندرقند برای هر ایزوله به‌طور مجزا در هر نسبت تهیه شد (۱۰ درصد باقیمانده). از ملاس چغندرقند در صنعت عمدتاً به‌عنوان ماده چسباننده گرانول استفاده می‌شود. مراحل تهیه گرانول به ترتیب زیر بوده است:

ترکیبات را در بشر ریخته و با پیپت استریل و با توجه به نسبت تعیین‌شده از مایه تلقیح باکتری و ملاس چغندرقند به‌تدریج اضافه شد و به‌آرامی بشر را به‌صورت دورانی چرخانده تا گرانول به دست آمد. در نهایت به دو قسمت مساوی تقسیم و یک قسمت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق که می‌تواند برای خشک‌کردن گرانول

1-serialdilution

مورداستفاده قرار بگیرد) و نیم دیگر را در پلیت شیشه‌ای ریخته و به آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (دمای مورداستفاده در صنعت برای خشک‌کردن گرانول) به مدت ۲ ساعت انتقال داده شد تا خشک شود. سپس، نمونه‌ها برای ۴ ماه در دمای اتاق نگهداری شد و در ماه اول هر ۱۰ روز یک‌بار و از ماه دوم هرماه شمارش به روش سری‌های رقت و کشت در محیط اسپربر انجام شد (۱۰). البته در صنعت بدون دخالت دست و به‌وسیله دستگاه گرانولاتور به همین شیوه انجام می‌شود و در نهایت بعد از خشک‌کردن، گرانول‌ها بر اساس اندازه دسته‌بندی می‌شوند. داده‌ها با استفاده از برنامه SPSS در سطح ۱ درصد مورد تجزیه آماری قرار گرفت و میانگین‌ها با روش Duncanمقایسه شدند. همچنین برای رسم نمودارها و جداول از نرم‌افزارExcel استفادهشد.

نتایج

اثر باکتری، ملاس چغندرقند، دما و زمان نگهداری بر جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات (گرانول)

با توجه به نتایج تجزیه واریانس اثرات جداگانه و ترکیبی؛ باکتری، ملاس چغندرقند، دما (۲۸ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان نگهداری (۴ ماه در دمای اتاق) بر لگاریتم جمعیت در سطح یک درصد معنی‌دار بود و فقط اثر ترکیبی باکتری ملاس چغندرقند معنی‌دار نبود جدول (۱).

مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات (گرانول،۴ ماه)

بر اساس مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت باکتری‌ها در گرانول بیشترین و کمترین جمعیت به ترتیب مربوط به باکتری‌های I_{2-4} و P_{39-1} بود (شکل ۱). بین لگاریتم جمعت باکتری‌های B_{4-2}، P_{21} وP_{15} و همچنین باکتری‌های P_6، CG_{14} وP_{39-1} تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی لگاریتم جمعیت دیگر باکتری‌ها در سطح یک درصد باهم تفاوت معنی‌دار داشتند و همچنین جمعیت اکثر باکتری‌ها که در ۲۸ درجه سانتی‌گراد خشک‌شده بودند در حد استاندارد بود ولی در ۴۰ درجه سانتی‌گراد به زیر حد استاندارد افت کرده بودند. (جمعیت استاندارد بر اساس دستورالعمل نحوه بررسی کودهای زیستی برای کودهای میکروبی فسفاته با کشت بر روی محیط اسپربر[1]، تراکم جمعیت باید در دوره دوماهه ۱×۱۰^{۵} سلول به ازای هر گرم کود و در ۶ ماه پس از تولید ۱×۱۰^{۴} سلول به ازای هر گرم کود، بیشتر باشد)[2] ملاک است.

در مقایسه لگاریتم جمعیت باکتری‌ها در گرانول‌هایی که در ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک‌شده بودند مشاهده شد که در هر دو نسبت ۱:۱ و ۲:۱ بیشترین جمعیت در همان روز تهیه گرانول و کمترین آن مربوط به روز ۱۲۰ام (۴ ماه) بعد از تهیه است البته در این مورد هم جمعیت در نسبت ۲:۱ از مایه تلقیح به ملاس چغندرقند در گرانول کمتر از نسبت ۱:۱ در همان روز تهیه گرانول هست. جمعیت همه ایزوله‌ها در نسبت ۱:۱ در پایان ماه چهارم در حد استاندارد تعریف‌شده برای کودهای میکروبی هست.ولی در نسبت ۲:۱ تا پایان ماه سوم صدق می‌کند و در ماه چهارم در اکثر ایزوله‌ها به کمتر از آن تنزل کرده است.جمعیت در روز ۲۰،۶۰ و ۹۰ ام بعد از تهیه در نسبت ۱:۱ تفاوت معنی‌داری با هم ندارند؛ و در نسبت ۲:۱ غیر از روز ۰، ۱۰ و ۶۰ امبعد از تهیه در سایر روزها تفاوت معنی‌داری باهم ندارند. از بین ایزوله‌ها دو ایزوله I_{2-4} وZ_4 بیشترین جمعیت را درطی ۴ ماه نگهداری در هردو نسبت ۱:۱ و ۲:۱ دارند.کمترین جمعیتدر نسبت ۱:۱ در طی ۴ ماه نگهداری مربوط به دو ایزولهP_{39-1} و P_6و در نسبت ۲:۱ دو ایزوله CG_{14} وP_{15} است.

مقایسه لگاریتم جمعیت گرانول‌های خشک‌شده در ۲۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که جمعیت در زمان تهیه در هر دو نسبت بیشترین و در ماه چهارم کمترین است و جمعیت باکتری‌ها در نسبت ۱:۱ در روز تهیه از نسبت ۲:۱ بیشتر هست. در هر دو نسبت ۱:۱ و ۲:۱ تا پایان ماه چهارم نگهداری جمعیت در حد استاندارد بوده است. جمعیت باکتری‌ها در نسبت ۱:۱ در روزهای ۲۰، ۳۰ و ۱۲۰ام و در نسبت ۲:۱ در روزهای ۲۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ام بعد از تهیه در اکثر ایزوله‌ها تفاوت معنی‌دار باهم ندارند؛ و گرانول‌های تهیه‌شده از ایزوله‌های I_{2-4}، Z_4 وC_{5-1} در هر دو نسبت بیشترین جمعیت را در طی مدت نگهداری دارند. کمترین جمعیت در هر دونسبت ۱:۱ و ۲:۱ مربوط به CG_{14} وP_{15} است.

در مقایسه درجه حرارت ۲۸ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد که برای خشک‌کردن گرانول‌ها مورداستفاده قرار گرفت مشخص شد که:۲۸ درجه سانتی‌گراد توانایی تأمین و حفظ جمعیت بیشتر باکتری را در طی مدت نگهداری نسبت به ۴۰ درجه سانتی‌گراد داشته است. البته در ۴۰ درجه سانتی‌گراد که برای خشک‌کردن گرانول‌ها در صنعت مورداستفاده است جمعیت قابل‌قبول و در حد استاندارد هست.

با توجه به شکل ۲ بیشترین و کمترین جمعیت باکتری‌ها در مدت‌زمان نگهداری به ترتیب مربوط به روز اول و ماه چهارم بود.وجود مواد آلی و قندی فراوان که در ماه‌های اول به مصرف باکتری رسیده و موجب افزایش جمعیت می‌شود و به‌تدریج با افزایش جمعیت و مصرف این مواد غذایی، به‌مرورکاهش‌یافته و همچنین مواد مترشحه حاصل از متابولیسم باکتری‌ها که برخی از آن‌ها برای باکتری‌ها سمی است؛ می‌تواند دلیلی بر این روند افت جمعیت در طی مدت زمان نگهداری باشد.

1-Sperber

۲- دستورالعمل نحوه بررسی کودهای زیستی، موسسه تحقیقات خاک و آب،۱۳۹۱

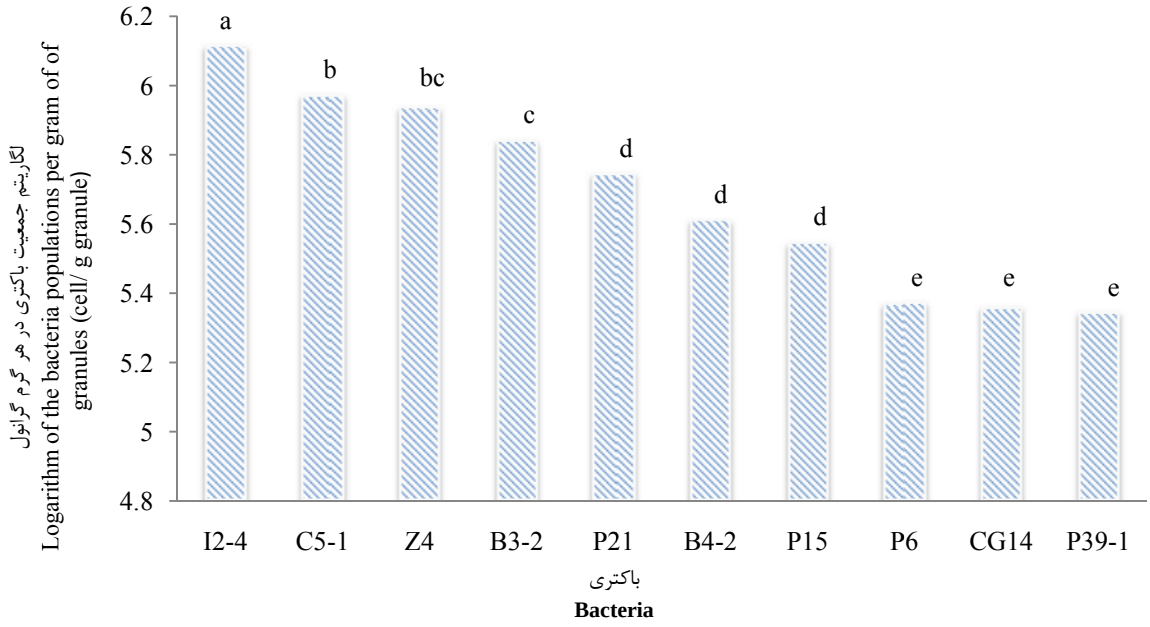
جدول ۱- تجزیه واریانس گرانول

Table 1-Analysis of varianceof granules

منبع تغییرات SourceChanges	درجه آزادی Degrees offreedom	مجموع مربعات sum of squares	میانگین مربعات average of squares
زمان Time	4	428.22	107.18**
دما Temperature	1	62.41	62.41**
ملاس Molasses	1	5.74	5.74**
باکتری Bacteria	1	40.49	4.50**
باکتری*ملاس Bacteria* Molasses	1	2.05	ns0.22
باکتری*دما Bacteria*Temperature	1	3.47	0.38**
باکتری*زمان Bacteria*Time	36	11.96	0.33**
باکتری*دما*ملاس Bacteria*temperature* Molasses	10	2.88	0.28**
باکتری*دما*ملاس*زمان Bacteria*Temperature* Molasses *Time	120	28.51	0.23**
خطا Error	400	52.71	0.13
کل Total	600	22404.68	

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ns غیر معنی‌دار در سطح ۱ درصد

**statistically significantat1%, nsnon-statistically significantat 1%



شکل ۱- مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات

Figure 1–Compare theaveragepopulationlogarithmphosphatesolubilizingbacteria

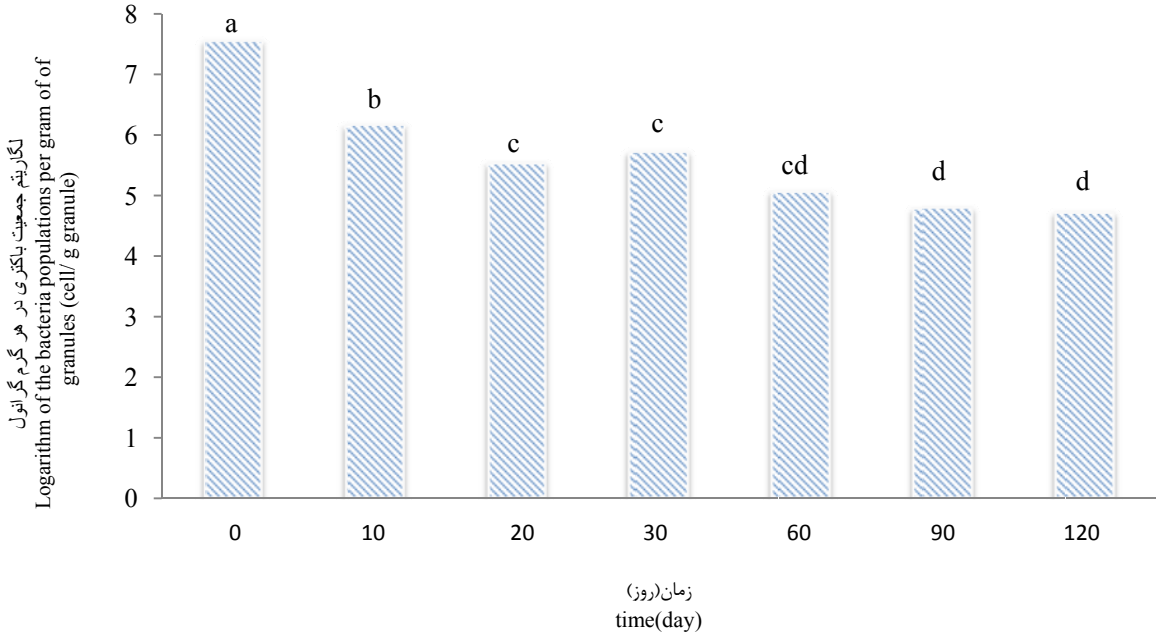
جدول ۲- مقایسه لگاریتم جمعیت گرانول‌هایخشک‌شده در ٤٠ درجه سانتی‌گراد در نسبت‌های ۱:۱ و ۲:۱ و در طی ٤ ماه نگهداری

Table 2-Compare thepopulationlogarithmgranulesaredriedat 40 ° Cina ratio of 1: 1and2: 1in4 months

باکتری‌ها Bacteria	٤٠ درجه سانتی‌گراد (40 ° C)													
	2:1							1:1						
	120	90	60	30	20	10	0	120	90	60	30	20	10	0
B_{3-2}	3.95^{a}	4.16^{a}	4.77^{abc}	5.55^{a}	4.91^{a}	5.98^{b}	6.9^{bc}	4.73^{b}	4.29^{a}	4.87^{ab}	5.36^{b}	5.05^{a}	6.32^{b}	7.38^{abc}
B_{4-2}	3.79^{a}	4.25^{a}	4.25^{bc}	5.23^{a}	5.18^{a}	5.33^{c}	7.24^{abc}	4.71^{b}	4.58^{a}	5.11^{ab}	5.18^{b}	5.19^{a}	6.14^{c}	7.74^{ab}
C_{5-1}	3.86^{a}	4.23^{a}	5.06^{a}	5.79^{a}	5.21^{a}	6.48^{a}	7.48^{ab}	4.6^{b}	4.43^{a}	5.1^{ab}	5.77^{ab}	5.31^{a}	6.45^{b}	7.83^{a}
CG_{14}	3.59^{a}	3.93^{a}	4.07^{c}	5.39^{a}	4.97^{a}	5.46^{b}	6.99^{bc}	4.32^{b}	4.2^{a}	5^{ab}	5.21^{a}	5.03^{a}	5.51^{f}	7.32^{abc}
I_{2-4}	4.05^{a}	4.34^{a}	5.15^{a}	5.78^{a}	5.23^{a}	6.23^{ab}	7.68^{a}	4.79^{a}	4.96^{a}	5.67^{a}	6.38^{a}	5.52^{a}	7^{a}	7.77^{ab}
P_{6}	3.71^{a}	3.93^{a}	4.02^{c}	5.28^{a}	4.84^{a}	5.36^{c}	7.12^{abc}	4.52^{b}	3.97^{a}	4.7^{b}	5.35^{b}	5.03^{a}	5.69^{e}	7.23^{bc}
P_{15}	3.72^{a}	4.16^{a}	4.87^{ab}	5.33^{a}	4.92^{a}	5.24^{c}	6.72^{c}	4.53^{b}	4.32^{a}	4.98^{ab}	5.04^{b}	5.13^{a}	5.93^{d}	7.45^{ab}
P_{21}	3.87^{a}	4.11^{a}	4.05^{c}	5.28^{a}	5.16^{a}	5.42^{c}	7.70^{a}	4.71^{b}	4.24^{a}	4.9^{ab}	5.16^{b}	4.74^{a}	5.54^{ef}	7.75^{ab}
P_{39-1}	3.71^{a}	4.08^{a}	4.05^{c}	5.48^{a}	4.85^{a}	4.63^{d}	7.26^{abc}	4.4^{b}	4.22^{a}	4.92^{ab}	5.25^{b}	4.85^{a}	5.46^{f}	6.96^{c}
Z_{4}	4.05^{a}	4.36^{a}	5.21^{a}	5.55^{a}	5.15^{a}	6.04^{b}	7.37^{abc}	4.87^{b}	4.47^{a}	5.27^{ab}	5.39^{b}	5.34^{a}	5.51^{f}	7.59^{ab}

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<0.01) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.01)



شکل ۲- مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات در زمان‌های مختلف بعد از تهیه گرانول

Figure 2-Compare theaveragelogarithmofpopulationphosphatesolubilizingbacteriaat different time intervalsafterthepreparationgranules

بحث و نتیجه‌گیری

فرآیند تولید کودهای گرانوله در صنعت مستلزم استفاده از ملاس چغندرقند به‌عنوان چسباننده مواد اولیه گرانول و همچنین خشک‌کردن آن در درجه حرارت بالا (حدود ۴۰°c) است. لذا لزوم استفاده از باکتری‌هایی که قدرت ماندگاری مناسبی در ملاس چغندرقند را داشته و همچنین مقاوم به حرارت بوده و یا قابلیت تولید اسپور را داشته باشد و همچنین نسبت‌های مختلف ترکیب مواد برای تهیه این کود زیستی حائز اهمیت است. به‌طورکلی با مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت باکتری‌ها در نسبت‌های مختلف ملاس چغندرقند و درجه حرارت‌های مختلف و همچنین نسبت مختلف ترکیب عناصر تشکیل‌دهنده گرانول؛ گرانول تولیدشده بر اساس استاندارد تعریف‌شده تا ۳ ماه جمعیت خود را حفظ کرد (دوره دوماهه ۱×۱۰^{۵} سلول به ازای هر گرم کود). ترتیب جمعیت در گرانول‌ها به قرار زیر بود:

گرانول نسبت ۱:۱، ۲۸°C> گرانول نسبت ۲:۱، ۲۸°C> گرانول نسبت ۱:۱، ۴۰°C> گرانول نسبت ۲:۱، ۴۰°C

با توجه به این مسئله که این استاندارد برای چهار ماه تعریف‌نشده است و در این تحقیق، جمعیت گرانول تولیدی در طی ماه چهارم نگهداری به $۱۰^{۴}$ رسید، نتایج حاصل مثبت بوده و قابلیت استناد برای

تولید این نوع کود میکروبی را دارند.

جدول ۳- مقایسه لگاریتم جمعیت گرانول‌هایخشک‌شده در ۲۸ درجه سانتی‌گراد در نسبت‌های ۱:۱ و ۲:۱ و در طی ٤ ماه نگهداری

Table 3-Compare thepopulationlogarithmgranulesaredriedat 28 ° Cina ratio of 1: 1and2: 1in4 months

باکتری‌ها Bacteria	۲۸ درجه سانتی‌گراد (28 ° C)													
	2:1							1:1						
	120	90	60	30	20	10	0	120	90	60	30	20	10	0
B_{3-2}	5.76^{a}	5.41^{a}	5.47^{a}	6.51^{a}	6.13^{a}	6.76^{a}	7.89^{a}	5.64^{abc}	5.97^{a}	6.09^{a}	6.52^{ab}	6.26^{a}	6.72^{c}	8^{ab}
B_{4-2}	4.81^{b}	5.01^{a}	5.12^{a}	6.4^{ab}	6^{a}	5.9^{c}	7.85^{a}	5.01^{bcd}	5.27^{b}	5.24^{b}	6^{ab}	5.94^{ab}	6.55^{c}	7.95^{abc}
C_{5-1}	5.64^{a}	5.39^{a}	5.38^{a}	6.41^{ab}	6.1^{a}	6.75^{a}	7.72^{ab}	5.69^{abc}	6.09^{a}	6.16^{a}	6.57^{a}	6.28^{a}	7.73^{a}	7.55^{bc}
CG_{14}	4.47^{b}	4.93^{a}	4.97^{a}	5.56^{bc}	5.87^{a}	6.46^{ab}	7.24^{c}	4.77^{d}	5.01^{b}	5.04^{b}	5.59^{ab}	5.83^{ab}	5.79^{d}	7.32^{c}
I_{2-4}	5.75^{a}	5.39^{a}	5.45^{a}	5.9^{abc}	8.8^{a}	6.57^{ab}	8.12^{a}	5.92^{a}	6.1^{a}	6.16^{a}	6.5^{ab}	6^{ab}	7.41^{ab}	8.42^{a}
P_{6}	4.71^{b}	4.9^{a}	5.06^{a}	5.5^{c}	6^{a}	6.24^{bc}	7.14^{c}	4.92^{bcd}	5.07^{b}	5.15^{b}	5.55^{b}	5.79^{ab}	5.89^{d}	7.52^{bc}
P_{15}	4.75^{b}	5.11^{a}	5.16^{a}	6.27^{abc}	6.15^{a}	5.95^{c}	7.83^{a}	4.85^{cd}	5.22^{b}	5.25^{b}	5.57^{b}	5.93^{ab}	7^{bc}	7.78^{abc}
P_{21}	4.92^{b}	5.02^{a}	5.04^{a}	5.98^{abc}	6.11^{a}	6.55^{ab}	7.84^{a}	5.05^{bcd}	5.24^{b}	5.27^{b}	5.63^{ab}	5.94^{ab}	6.87^{bc}	7.86^{abc}
P_{39-1}	4.65^{b}	5.01^{a}	5.02^{a}	5.47^{c}	5.73^{a}	5.96^{c}	7.36^{bc}	4.99^{bcd}	5.04^{b}	5.09^{b}	5.59^{ab}	5.58^{b}	5.99^{d}	7.86^{abc}
Z_{4}	5.82^{a}	5.54^{a}	5.63^{a}	5.73^{abc}	6^{a}	6.76^{a}	7.92^{a}	5.76^{ab}	5.19^{a}	6.28^{a}	6.56^{a}	6.41^{a}	7.38^{ab}	8.78^{abc}

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<0.01) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.01)

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از گرانول تهیه‌شده مشخص شد که نسبت ملاس چغندرقند و مایه تلقیح باکتری، دمای خشک شدن و همچنین زمان نگهداری بر قابلیت ماندگاری باکتری تأثیرگذار بوده و می‌توان با بررسی دقیق‌تر به نتایج قابل قبولی برای تولید این نوع کود میکروبی دست‌یافت؛ البته می‌توان با بررسی‌های اجمالی و همچنین شناسایی مولکولی باکتری‌ها و شناسایی ژن‌های مطلوب آن‌ها و انتقال ژن بین باکتری‌ها به‌منظور افزایش تحمل به درجه حرارت بالا به‌وسیله تولید اسپور و همچنین انتقال ژن بین باکتری‌ها با جمعیت بالا و غیر متحمل نسبت به ملاس چغندرقند و باکتری‌های متحمل به ملاس چغندرقند ولی با جمعیت پایین؛ باکتری‌هایی با جمعیت بالا با قدرت تحمل بالا به ملاس چغندرقند به نتایج مطلوب‌تری دست‌یافت. متعاقباً مصرف کودهای شیمیایی فسفره و همچنین اثرات زیان‌بار مصرف بیش‌ازحد کودهای شیمیایی را کاهش داده و به حفظ محیط‌زیست و حفظ منابع در دسترس کمک کند.

منابع

1- Ahmed S. 1995. Agriculture-Fertilizer Interface in Asia-Issues of Growth and sustainability, Oxford & IBH Publishing Company Private Limite, New Delhi.

2- Asea P.E.A., Kucey R. M. N. and Stewart J.W.B.1988. Inorganic phosphate solubilization by two *penicillium* species in solution culture and soil, Soil Biological and Biochemistry, 4:459-464.

3- BrooksR.R.1998.Plants that hyper accumulate heavy metals, United Kingdom: The Centre for Agriculture and Bioscience International (CABI).publication.

4- Dai J., Becquer T., Rouiller J., Reversat H.,Bemhard G., and Lavelle F. 2004. Influence of heavy metals on C and N mineralization and microbial biomass in Zn-, Cu- and Cd- contaminated soils,A companion journal of Agriculture, Ecosystems & Environment, 25:99-109.

5- Davarinejad G., Haghnia G., and Lakzian A. 2004. Effect of animal fertilizers and enriched compost on wheatyield, Agriculture Technology and Science Journal, 18:101-108. (in Persian with English abstract)

6- Ehteshami S.M.R.,Hakimian F. and Yousefie Rad M.,Chaichi M.R.2012.Effect of the integration in phosphate fertilizer different levels and phosphate solubilizing bacteria on forage quantitative and qualitative of two barley cultivars, Agronomy Journal (Pajouhesh&Sazandegi), No:102 pp:141-150. (in Persian)

7- Elliott L.F., and Wildung R.E. 1992. What biotechnology means for soil and water conservation, Journal of Soil and Water Conservation, 47:17-20.

8- Franco-Correaa M., Quintana A., Duque C., Suarez C., Rodriguez M.X. and Barea J.M. 2010. Evaluation of *actinomycete* strains for key traits related with plant growth promotion and *mycorrhizal* helping activities, Applied Soils Ecology, 45:209–217.

9- Garbaye J.1994. Helper bacteria-a new dimension to the mycorrhizal symbiosis, New Phytologist, 128:197-210.

10- Khavazi k. 2012.Instructions on how to check bio-fertilizers, Soil and Water Research Institute, Iran. (in Persian)

11- Jilani G., Akram A., Ali R.M., Hafeez F.Y., Shamsi I.H., Chaudhry A.N. and Chaudry A.G. 2007. Enhancing crop

growth, nutrient availability, economic and beneficial rhizosphere microflora through organic and biofertilizers,Annals of Microbiology, 57:177-183.
12- KacarB. and KatkatV. 2010.Bitkibesleme.pp.217-289.4thBaski.Nobel Yaymevi, Ankara.
13- Kader M.K., Mmian H. and Hoyue M.S. 2002. Effects of *Azotobacter* inoculants on the yield and nitrogen uptake by wheat, Journal of Biological Sciences, 2: 250-261.
14- Karthikeyan N., Prasana R.P., Nain L., and Kaushik B.D. 2007.Evaluting the potential of plant growth promothng cyanobacteria as inoculant for wheat, European Journal of Soil Biology, 43:23-30.
15- Khan M.S., Zaidi A., and Wain P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture –A review, Agronomy for Sustainable Development, Dev.27:29-43.
16- Kiani-rad M. 1995.Evaluation of phosphate solubilizing microorganisms and their effects on the reduction of phosphate fertilizers in the cultivation of soy, Master thesis, Tehran University, Karaj, Iran. (In Persian)
17- Liu R.J., and Chen Y.L., 2007.Mycorrhizal Symbiosis (in Chinese), Science Press (www.sciencep.com), Beijing.ISBN 978-7-03-017290-7,page 447.
18- Malakoti M.J. 1995. sustainable agriculture and increase performance by optimizing the use of fertilizers in Iran, dissemination of agricultural education. Karaj, Iran. (In Persian)
19- Malboobi M.A., Behbahani M., Madani H., Owlia P., Deljou A., Yakhchali B., Moradi M., and Hassanabadi H. 2009. Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25:1479-1484.
20- Mehrotra V.S. (ed.). 2005. Mycorrhiza: Role and Applications,Allied Publishers Limited, New Dehli.
21- Mehvarz S., and ChaichiM.R. 2008.Effect of Solubilizing Microorganisms sndPhosphrus Chemical Fertilizer on Forage and Grain Quality of Barely(*Hordeum vulgar L.*), American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 3(6)855-860.
22- Molla M.A.Z., and Chowdhury A.A. 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soil, Plant and Soil, 78: 393-399.
23- Rai S.N. and GaurA.C. 1988. Characterization of *Azotobacter spp.* Effect of *Azotobacter* and *Azospirillum* as inoculant on the yield and N-uptake of wheat crop, Plant and Soil, 34:131-134.
24- Safari M. 2014. The tendency of conventional agriculture (Intensive Agric.) Sustainable agriculture (Sustainable Agriculture) solutions to improve the quality of soils in semi-arid regions of Iran, 1th national conference on sustainable management of soil resources and the environment, Kerman,martyrBahonar University. (In Persian)
25- SobbaRao N.S. 1986. Soil microorganisms and plant growth, Oxford and IBH publishing Company, put. LTD.
26- SobbaRao N.S. 1988. Biofertilizers in Agriculture, 2nd, Oxford and IBH publishing Company, New Dehli.
27- Stevenson F.J. 2005. Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients, John Wiley and Sons, New york.
28- Turk M.A., Assaf T.A., Hameed K.M., and Al-Tawaha A.M. 2006. Significance of Mycorrhiza, World Journal of Agricultural Sciences, 2(1):16-20.

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 1, Mar.-Apr. 2017, p. 254-262

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۱، فروردین –اردیبهشت ۱۳۹۶، ص. ۲۶۲-۲۵۴

Study of Viability of Phosphate Solubilizing Bacteria in Phosphate granules

H. RajabiHashjin[1]- A.R. Fallah[2*]- G.R.BakhshiKhaniki[3]

Received: 16-01-2016
Accepted: 15-05-2016

Introduction: sustainable development and the environment are interconnected. Sustainable agriculture is continuous utilization of a farm with respect to various aspects of environmental conditions by using fewer inputs (other than Bio-fertilizers). Phosphorus is one of the essential elements for the plants. Management of soil is possible by using biological fertilizers pillar of sustainable agriculture and providing some of the phosphorus needed by plants via bio-fertilizers. Phosphorus deficiency is extremely effective on the plant growth and productivity. The application of phosphorus fertilizers is expensive and dangerous. In addition, phosphorus in the soilmay become insoluble and will be unavailable to the plants. Studies showed that phosphate solubilizing bacteria in the soil rhizosphere are active and by root exudates solve insoluble phosphates such as tricalcium phosphate, and form absorbable P for plant. Consequently, the use of microbial fertilizers could reduce excessive use of chemical fertilizers and lead to decrease their harmful effects and protect the environment and conservation of available resources. The biological phosphate fertilizer industry uses sugar beet molasses as a binder and drying granules at high temperatures. Therefore, it is important to evaluate the durability of the bacteria in molasses at high temperature.

Materials and Methods: This study was designed as completely randomized design in a factorial arrangement.10 isolates were selected and the ratios of 50%, 25%, 15% and 10% of the apatite, organic matter, sulfur and soluble granule (ratio 1: 1 and 2: 1 bacteria and molasses), respectively, for each isolate was prepared. The final product was dried at 28 and 40 °C and remained for 4 months and population counted at first day and 10, 20, 30, 60, 90 and 120 days after the preparing. The population was counted by the serial dilution technique and cultured at Sperber media.

Results and Discussion: Comparing the average logarithm of population of bacteria in the granules indicated the highest proportion in the granules on the first day and the lowest population on 120 days (4 months), andthe ratio of 1: 1 inoculant and molasses had the largest population than the 2:1. The highest population was observed in 1:1 dried granules at 28 °C, but, some of 1:1 dried granules at 40 °C were consistent with the defined standards. Overall, bacteria I_{2-4}, Z_4 and C_{5-1} showed the greatest amount of population and the population had more power to maintain the standards among the isolates. The granules produced according to the defined standard (two-month period, 10^5 cell per gram of fertilizer) are dried at 28 °C in both 1: 1 and 2: 1 to the end of 4 months in the standard population. Granules dried at 40 °C for 1: 1 ratio of the population by the end of 4 months in the standard range. In the case of the most isolated granules at the ratio of 2:1 until the end of the second month, the population were within the standard range but at the end of the third month, they come lower than standard except I_{2-4}, Z_4 and C_{5-1}. The total population of the granules was as following: Granules 1: 1, 28 °C> 2: 1, 28 °C> 1: 1, 40 °C> 2: 1, 40 °C. Considering to the fact that this standard is undefined for four months, but in this study, the population was 10^4 granules in the fourth month.

Conclusion: Based on the results, some of these conditions could keep their population and population decline was less. In general, it can be concluded that the granular organic fertilizer phosphorus in the industry of phosphate solubilizing bacteria with sugar beet molasses as a binder and drying at 40 °C can be used The results were positive and the granules can be cited to the production of this type of microbial fertilizer. Considering to the results, it was found that the proportion of molasses and inoculant, drying temperature and storage time were effective on viability of bacteria. Also, instead of using a train of bacteria, phosphate solubilizing bacteria, a combination of any of these bacteria in a field lead to better results. It is clear that by a comprehensive study, the molecular identification of bacteria, and detection of desire genetic loci and then gene transfer between bacteria for increasing of high temperature resistance by spour production and also, gene transfer between bacteria with

1-Graduate Student inAgricultural Biotechnology, University of Payam Noor East Tehran
2-Associate Professor of Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Karaj, Iran
(*-Corresponding Author Email: Rezafayah@yahoo.com)
3-Professor, Department of Agricultural Sceince (Biotechnology), Faculty of University of Payam Noor

high population and non-tolerance to sugerbeet molasses and tolerant bacteria to sugar beet molasses but low population; we can achieve bacteria with high population and high tolerance to sugar beet molasses and consequently achieve to favorable results. This result could decrease chemical phosphate fertilizers usage and their harmful effects and help to protect the environment and available resources.

Keywords: Biological Fertilizer, Granulated, Molasses, Phosphor, Solubilizing Bacteria, Temperature