نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۷، ص. ۱۶۷-۱۵۵

Journal of Water and Soil
Vol. 32, No. 1, Mar.-Apr. 2018, p. 155-167

جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاتی

بهمن خوشرو[۱] – محمدرضا ساریخانی[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۷

چکیده

در فرمولاسیون کودهای میکروبی فسفاتی که غالباً به فرم گرانوله تهیه می‌شوند از باکتری‌های حل‌کننده فسفات استفاده می‌شود. از جمله محدودیت‌های تولید این نوع کود، از بین رفتن باکتری‌ها در فرایند تهیه و خشک نمودن گرانول‌ها می‌باشد. بر این اساس در این تحقیق اقدام به جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما شد و تحمل دمایی و توانایی انحلال فسفات (از منابع سنگ فسفات و تری‌کلسیم فسفات) در باکتری‌های بومی جدا شده از خاک، مورد ارزیابی قرار گرفت. از پنج باکتری (جدایه‌های RPS4، RPS6، RPS7، RPS8 و RPS9) با قابلیت تولید هاله شفاف تنها دو باکتری (RPS7 و RPS9) قادر به تحمل دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ساعت بودند. در محیط اسپربر جامد حاوی تری‌کلسیم فسفات، باکتری RPS9 و RPS7 به ترتیب با دارا بودن مقادیر ۲/۶۰ و ۲/۲۷ برای نسبت (HD/CD) بعد از گذشت ۱۲روز، قدرت بالایی در امر انحلال فسفات معدنی نامحلول داشتند. میزان انحلال فسفات کم‌محلول در روش کمی نیز برای دو باکتری RPS9 و RPS7 به ترتیب ۵۳۱/۸ و ۳۲۴/۱ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. نتایج زنده‌مانی باکتری‌ها نیز نشان داد که زنده‌مانی جمعیت میکروبی در حالت بدون تیمار دمایی تا ۶ ماه و در حالت تیمار دمایی به ۴ ماه کاهش یافت. شناسایی مولکولی RPS7 و RPS9 حاکی از آن بود که هر دو جدایه متعلق به گونه *Pantoea agglomerans* هستند.

واژه‌های کلیدی: باکتریهای محرک رشد گیاه، زنده‌مانی، فرمولاسیون کودهای میکروبی، مقاومت دمایی

مقدمه

فسفر بعد از نیتروژن به عنوان عنصر غذایی حیاتی برای گیاهان و ریزجانداران محسوب می‌شود. فرم‌های معدنی این عنصر در خاک به صورت ترکیب با کلسیم، آهن آلومینیوم و فلوئور است در حالی‌که فرم‌های آلی آن غالباً به شکل فسفولیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و فیتین یافت می‌شود (۶). فسفر در خاک‌ها به دو شکل آلی و معدنی به مقدار فراوان و در محدوده ۱۲۰۰mg/kg–۴۰۰ وجود دارد (۱۸). اما غلظت فسفات محلول در خاک معمولاً خیلی پایین بوده و در سطح ۱ mg/kg یا کمتر می‌باشد. بنابراین در غالب خاک‌ها از نظر مقدار کل فسفر مشکلی وجود ندارد بلکه فراهمی و در دسترس بودن آن مشکل می‌باشد (۲۷). علی‌رغم بالا بودن فسفر کل خاک‌ها، دسترسی آن برای گیاه کم است و قسمت عمده فسفر خاک به همراه کاتیون‌های فلزی رسوب کرده و از دسترس گیاه خارج می‌شود و به همین سبب نیز استفاده از کودها چندان نتیجه‌بخش نیست (۱۷). بر خلاف نیتروژن، منابع تولیدکننده فسفر تجدیدپذیر نیستند و این منابع تا چند دهه دیگر به اتمام می‌رسند، از طرف دیگر آلودگی‌های روزافزون ناشی از کاربرد کودهای شیمیایی فسفاتی به خصوص آلودگی آن‌ها به عنصر سنگین کادمیم، ضرورت یافتن جایگزین مناسب برای رهاسازی فسفات‌های تجمع یافته در خاک را ایجاب می‌کند، بنابراین یافتن راه‌حل‌های مناسب برای رفع این مشکلات ضروری است (۱۲). اهمیت یافتن جایگزینی مناسب برای رهاسازی فسفات‌های تجمع یافته در خاک زمانی بیشتر احساس می‌شود که بر این امر واقف گردیم که منابع فسفاتی موجود در خاک قابلیت تامین فسفات مورد نیاز گیاهان برای تولید بهینه آن‌ها را تا ۱۰۰ سال دارا می‌باشد (۴). بنابراین کافی است که این منبع عظیم فسفر را به صورتی برای گیاه قابل جذب و استفاده نمود. یکی از راه‌های عملی برای استفاده از فسفر تجمع پیدا کرده در اراضی، بکارگیری کودهای زیستی فسفاته می‌باشد. این نهاده‌های زیستی در واقع حاوی ریزجانداران ریزوسفری محرک رشد گیاه هستند که از طریق فرآیندهای ویژه‌ای می‌توانند

۱ و ۲– دانشجوی دکتری و دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
(*– نویسنده مسئول: (Email: rsarikhani@yahoo.com
DOI: 10.22067/jsw.v32i1.68306

حلالیت ترکیبات فسفر رسوب کرده در خاک را افزایش داده و بدین صورت بخشی از فسفر مورد نیاز گیاه را تامین نمایند (۲۳).

کودهای زیستی یکی از مهم‌ترین اجزاء کشاورزی آلی و پایدار محسوب می‌شوند که استفاده صحیح از آن‌ها می‌تواند ضمن افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات کشاورزی، کاهش مصرف بعضی از انواع کودهای شیمیایی و در نتیجه حفظ محیط زیست را نیز به دنبال داشته باشد (۲۰). گزارش‌های متعددی وجود دارد که توانایی سویه‌های مختلف باکتریایی را برای انحلال فسفاتهای معدنی نامحلول همچون تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، دی‌هیدروکسی آپاتیت و خاک فسفات، نشان می‌دهد (۹، ۱۱ و ۲۱). 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 (۱ و ۵). تعداد زیادی از ریزجانداران در شرایط آزمایشگاهی توانایی انحلال فسفات نامحلول را نشان داده‌اند (۲، ۱۴ و ۲۲). این دسته از ریزجانداران گرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند، ولی بخشی از آن که در محیط آزاد شده است در اختیار گیاه قرار می‌گیرد. همچنین فسفر موجود در زیست‌توده‌ی میکروبی که به شکل غیرمتحرک می‌باشد نیز به صورت بالقوه قابل استفاده برای گیاهان می‌باشد (۳).

کودهای میکروبی نوعی از کودهای زیستی هستند که در آن بر بستری از مواد آلی- معدنی، از ریزجانداران مفید بهره برده می‌شود. یکی از کودهای میکروبی مهم، کود میکروبی فسفاتی می‌باشد که با توجه به اهمیت فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای محصولات کشاورزی، استفاده از آن مورد توجه است (۱۴). کود میکروبی فسفاتی ممکن است به صورت پودری یا گرانوله استفاده شود که در فرایند گرانول‌سازی، پس از اختلاط اجزاء تشکیل‌دهنده از حرارت (۵۰-۴۰ درجه سلسیوس) جهت خشک نمودن کود تولیدی استفاده می‌شود، همچنین در این نوع کود به دلیل دارا بودن رطوبت اندک (حدود ۴ درصد) شرایط برای بقا باکتری نامناسب است. چنین شرایطی باعث از بین رفتن باکتری‌های افزوده شده به بستر خواهد شد. لذا در این پژوهش جداسازی، ارزیابی و شناسایی باکتری‌های کارآمد حل‌کننده فسفات با ماندگاری بالا و مقاوم به دما مد نظر قرار گرفت، تا علاوه بر اندازه‌گیری‌های انحلال فسفات در محیط اسپربر جامد و مایع در حضور منابع فسفات کم‌محلول (سنگ فسفات و تری‌کلسیم فسفات)، تحمل دمایی، تراکم جمعیت باکتری و ماندگاری آن در بستر تهیه شده سنجیده شود. ضرورت دستیابی به یک گونه میکروبی کارآمد با زمان ماندگاری بالا و قابلیت کاربرد به عنوان کودهای میکروبی فسفاتی گرانوله موضوع این تحقیق است و ضرورت پرداختن به آن احساس می‌شود. در حال حاضر این نوع از باکتری‌ها کمتر در دسترس می‌باشند و تحقیقات اندکی در این زمینه صورت گرفته است، لذا در این تحقیق به این جنبه‌ها پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما

ابتدا بر روی خاک‌های نمونه‌برداری شده تیمار دمایی ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت اعمال شد (فرض آزمایش بر آن است که در فرایند تولید کود میکروبی چنین دمایی در این مدت زمانی باعث ایجاد تنش دمایی و خشکی شود) و سپس سری‌های رقت از آن‌ها تهیه شد. از چهار رقت پایانی (10^{-9}، 10^{-8}، 10^{-7} و 10^{-6}) در ۲ تکرار به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط جامد اختصاصی Sperber انتقال داده شد. بعد از گسترده نمودن سوسپانسیون میکروبی از رقت‌های مورد نظر در محیط کشت اسپربر جامد و ظاهر شدن کلنی‌ها، غربالگری و جداسازی باکتری‌ها انجام شد. توجه به مقاومت به تیمار دمایی اولیه و در ادامه توانایی رشد در محیط اسپربر جامد، انحلال فسفات کم محلول (تشکیل هاله شفاف)، فنوتیپ و ریخت کلنی باکتری‌ها، موارد مورد توجه در جداسازی باکتری‌ها بود (۷).

اعمال تیمار دمایی

ارزیابی تحمل دمایی (تیمار دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت) باکتری‌ها در سه مرحله انجام گرفت، الف: تیمار دمایی اولیه روی خاک‌های نمونه‌برداری شده به منظور غربالگری باکتری‌های مقاوم به دما، ب: کشت خالص باکتری (در این حالت از هر جدایه کشت خالصی تهیه شد و سپس کشت نقطه‌ای از آن در محیط اسپربر جامد تهیه شد و در شرایط فوق گرماگذاری شد) و ج: باکتری افزوده شده به بستر (پس از تامین جمعیت میکروبی اولیه مناسب (10^{7} CFU/g) در بستر میکروبی در شرایط فوق گرماگذاری شد و در ادامه شمارش جمعیت میکروبی و زنده‌مانی ارزیابی شد) (۷).

تهیه کود میکروبی فسفاتی

به منظور تهیه کود میکروبی فسفاتی پودری برای آزمایش، به شرح زیر اقدام شد. برای تهیه بستر اولیه جهت افزودن مایه تلقیح باکتریایی از بستر پایه سنگ فسفات (با آنالیز: ۱٪ ±۳۶/۵: P_2O_5، ۱٪±۳/۷: Fe_2O_3، ۴٪±۵۰: CaO، ۱٪±۳/۵: SiO_2، ۰/۵±۰/۱٪: MgO، ۰/۰۵٪: SO_3، ۱٪±۳: F، ۰/۰۳٪±۰/۱۸: CL، ۵ppm±۱۰: Cd)، باگاس و گوگرد استفاده شد. این اجزاء به ترتیب به نسبت ۴۵: ۳۰ : ۱۵ مخلوط شدند. پس از اختلاط ترکیب فوق، به ۹۰ گرم از این ترکیب ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد تا رطوبت اولیه

تامین شود، سپس از کشت باکتری‌های مورد استفاده در آزمایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری (تقریباً 10^8 CFU/ml) برداشته و پس از رقیق‌سازی آن با آب مقطر استریل به مقدار 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 (۸).

شمارش تعداد باکتری و بررسی زنده‌مانی باکتری

با توجه به اینکه برآورد و شمارش میکروبی به عنوان یکی از پارامترهای مهم در کودهای میکروبی مورد بررسی قرار می‌گیرد، لذا کود میکروبی تهیه شده به دو صورت مورد شمارش میکروبی قرار گرفت: الف: نیمی از کود میکروبی تهیه شده، با حفظ شرایط اولیه در دمای معمولی نگهداری شد و ب: نیم دیگر پس از تحمل دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت، تعیین جمعیت شد. برای مشخص نمودن جمعیت میکروبی، ابتدا سری‌های رقت تهیه شد و از رقت‌های پایانی (10^{-6}، 10^{-5}، 10^{-4} و 10^{-3}) در ۲ تکرار به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط اسپربر جامد انتقال داده شد (۱۳). برای تهیه اولین رقت (10^{-1}) ۱۰ گرم از کودهای میکروبی تهیه شده به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد و سایر رقت‌ها تا رقت 10^{-6} در لوله های حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با انتقال ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. شمارش جمعیت در زمان شروع آزمایش (صفر)، ۲، ۴ و ۶ ماه بعد از تلقیح بر روی نمونه‌ها انجام گرفت.

آزمون نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

برای انجام این آزمون از ۲ نوع محیط کشت Sperber (۲۶) استفاده شد که در آنها از منابع فسفر نامحلول متفاوت یعنی تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات به عنوان تنها منبع فسفر به صورت جداگانه استفاده شده بود. برای دو باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته و سطح هر پتری به شش قسمت مساوی تقسیم شد، مرکز هر قسمت با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح گردید، ظروف پتری تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. تمامی پلیت‌ها در سه نوبت ۳، ۵، ۷ و ۱۲ روز پس از تلقیح از انکوباتور خارج شده و قطر کلنی رشد یافته[1] (CD) و نیز قطر هاله شفاف[2] (HD) حاصل از انحلال فسفات به دقت اندازه‌گیری شد، متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) در روز دوازدهم برای هر جدایه محاسبه گردید (۲۴).

آزمون کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

در این مرحله برای بررسی دقیق‌تر مقدار حل‌کنندگی فسفات هر باکتری با سه تکرار در محیط کشت اسپربر مایع کشت شد. ارلن‌های حاوی محیط مایع تلقیح شده و نمونه شاهد در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۸ درجه سلسیوس با شیک ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴۴ ساعت قرار گرفتند. سوسپانسیون‌ها در دور ۵۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. 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 (۲۱). آزمون انحلال فسفات در حضور هر دو منبع فسفر (تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات) به صورت جداگانه بررسی شد.

شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما

برخی از ویژگی‌های شکل‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌ها به کمک رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز و کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند. برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها به روش 16S rRNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R خریداری شده از شرکت ژن فناوران استفاده شد (جدول ۱). برنامه PCR به کار رفته دارای ۳۰ چرخه بود که در دستگاه ترموسایکلر Flexigene انجام گرفت. این چرخه‌ها شامل، یک چرخه نخستین با دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۴ دقیقه، در ادامه دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، دمای ۵۳ درجه سلسیوس (دمای پیوند آغازگر) برای ۱ دقیقه و دمای فراوان شدن ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه بود که در پایان یک چرخه اضافی دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه نیز اعمال شد. یادآور می‌شود که برای انجام PCR از تک کلنی باکتری‌ها بهره‌گیری شد و بدین گونه از استخراج DNA ژنومی باکتری چشم پوشی شد. ابتدا ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل را داخل تیوب ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته، سپس لوپ مستقیم استریل شده در شعله را به کلنی تماس داده و به داخل آب انتقال داده، سپس به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شد تا DNA باکتری در محلول آزاد شود. با فراهم نمودن سایر اجزاء PCR تنها ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی DNA به آن انتقال داده شد. نوارهای پدیدار شده (نزدیک ۱۵۰۰ جفت باز) پس از ران شدن محصول PCR بر روی ژل آگاروز و اطمینان از تکثیر باند مورد نظر، بقیه DNA تکثیر شده از قطعه رمزکننده 16S rRNA جهت توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفت. پس از توالی‌یابی نمونه‌ها، توالی‌های مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI[3]، BLAST-n[4] شدند و به بررسی یافته‌های آن‌ها پرداخته شد

1- Colony Diameter
2- Halo Diameter
3- National center for biotechnological information
4- Basic local alignment search tool (for Nucleotide)

(۱۰).

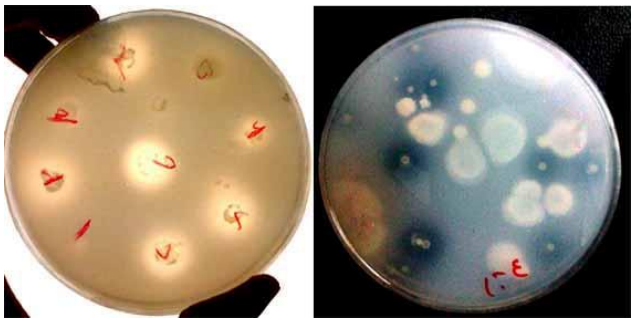
جدول ۱- آغازگرهای عمومی برای تکثیر 16S rRNA باکتری‌ها
Table 1- General primers for amplification of bacterial 16S rRNA

نام آغازگرها Primers name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای پیوند Annealing temperature
27F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	Tm:53
1492R	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'	

نتایج و بحث

غربالگری دمایی و انحلال فسفات کم محلول

از نمونه خاک‌های مورد بررسی، ۹ کلنی باکتری با فنوتیپ مختلف بر روی محیط جامد اسپربر قادر به رشد بودند که از میان آن‌ها تنها ۵ باکتری قادر به تشکیل هاله شفاف (جدایه‌های RPS4، RPS6، RPS7، RPS8 و RPS9) بودند (شکل ۱). از بین این ۵ جدایه نیز بعد از کشت به روش نقطه‌گذاری در محیط اسپربر جامد و اعمال تیمار دمایی، تنها دو باکتری RPS9 و RPS7 قادر به رشد و زنده‌مانی تحت دمای ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱۶ ساعت بودند.



شکل ۱- تصویری از غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات با توجه به ایجاد هاله شفاف در اسپربر جامد
Figure 1- Screening of phosphate solubilizing bacteria which produced halo zone in solid Sperber medium

توان حل‌کنندگی فسفات نامحلول باکتری‌های بکاررفته درکودهای میکروبی

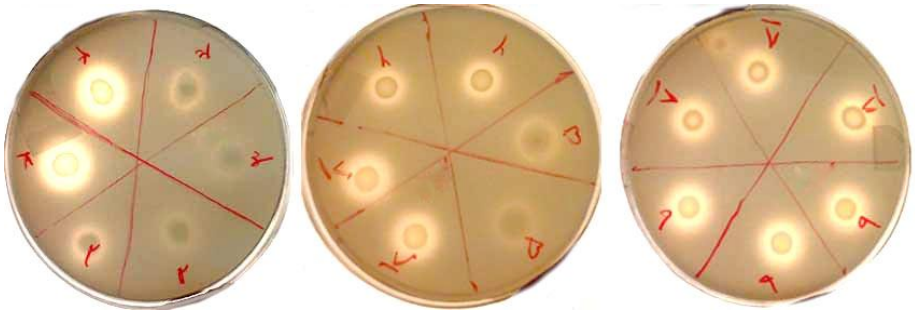
آزمون نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

اندازه‌گیری قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول از دو منبع فسفات کم‌محلول (تری‌کلسیم‌فسفات و سنگ فسفات) و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) مشخص کرد که بین جدایه‌ها از نظر تشکیل هاله تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

جدول۲- تجزیه واریانس توان انحلال فسفات نامحلول توسط باکتری‌های بکار رفته در کودهای میکروبی
Table 2- Analysis of variance of insoluble phosphate dissolution capacity by bacteria used in microbial fertilizers

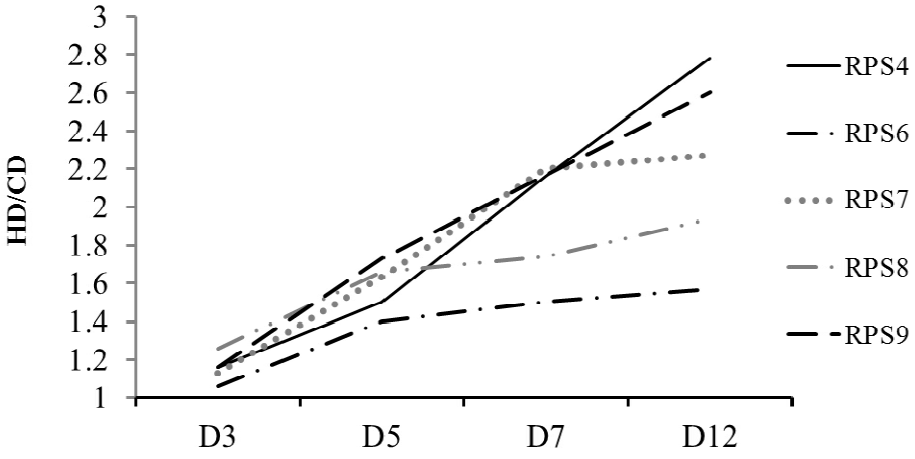
منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares
باکتری Bacteria	4	0.589**
زمان Time	3	3.189**
باکتری * زمان Bacteria * Time	12	0.162**
خطا Error	40	0.008
ضریب تغییرات (٪) (٪) Coefficient of variation	8.16	

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد ($P<0.01$)
** Significant at 1% level ($P<0.01$)



شکل ۲- تشکیل هاله توسط جدایه‌های باکتریایی در محیط اسپربر جامد

Figure 2- Formation of halo by bacterial isolates in solid Sperber medium



شکل ۳- توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول توسط جدایه‌های باکتریایی در محیط اسپربر جامد

Figure 3- Insoluble phosphate dissolution capacity by bacterial isolates in solid Sperber medium

در محیط اسپربر حاوی تری‌کلسیم‌فسفات، باکتری RPS4، RPS9 و RPS7 به ترتیب با دارا بودن مقدار نسبت ۲/۷۸، ۲/۶۰ و ۲/۲۷ بعد از گذشت ۱۲روز، قدرت بالایی در امر انحلال فسفات معدنی نامحلول داشتند و دو باکتری RPS8 و RPS6 به ترتیب با دارا بودن نسبت‌های ۱/۹۴ و ۱/۵۷، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (شکل ۳). شکل ۲ توان تشکیل هاله در محیط اسپربر جامد را نشان می‌دهد. در محیط کشت سنگ فسفات هیچ هاله‌ای مشاهده نشد.

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 تری‌کلسیم فسفات، ۳ جدایه دارای نسبت HD/CD بالای ۴ بودند و بالاترین مقدار حل‌کنندگی فسفر در روش کمی نیز در بین این جدایه‌ها ۳۰۵/۴۹µg/ml بود (۱۶).

آزمون کمی قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اولاً بین دو منبع فسفات کم‌محلول و ثانیاً بین باکتری‌ها از نظر انحلال فسفات تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد (جدول ۳). در محیط اسپربر تری‌کلسیم فسفات مایع، باکتری RPS4 و RPS9 به ترتیب با دارا بودن مقدار ۵۵۹/۷ و ۵۳۱/۸ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین مقدار حل‌کنندگی را از خود نشان دادند و باکتری‌های RPS8 و RPS7 در رتبه بعدی قرار داشتند (شکل ۴). باکتری RPS6 دارای کمترین مقدار حل‌کنندگی فسفات نامحلول بود (۱۹۶/۶ mg/l). همین روند در حضور سنگ فسفات هم دیده شد. گرچه سنگ فسفات به عنوان منبع فسفر مورد استفاده در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاتی می‌باشد اما نتایج آزمایش نشان داد که باکتری‌ها به میزان بالاتری قادر به انحلال فسفر از تری‌کلسیم فسفات هستند.

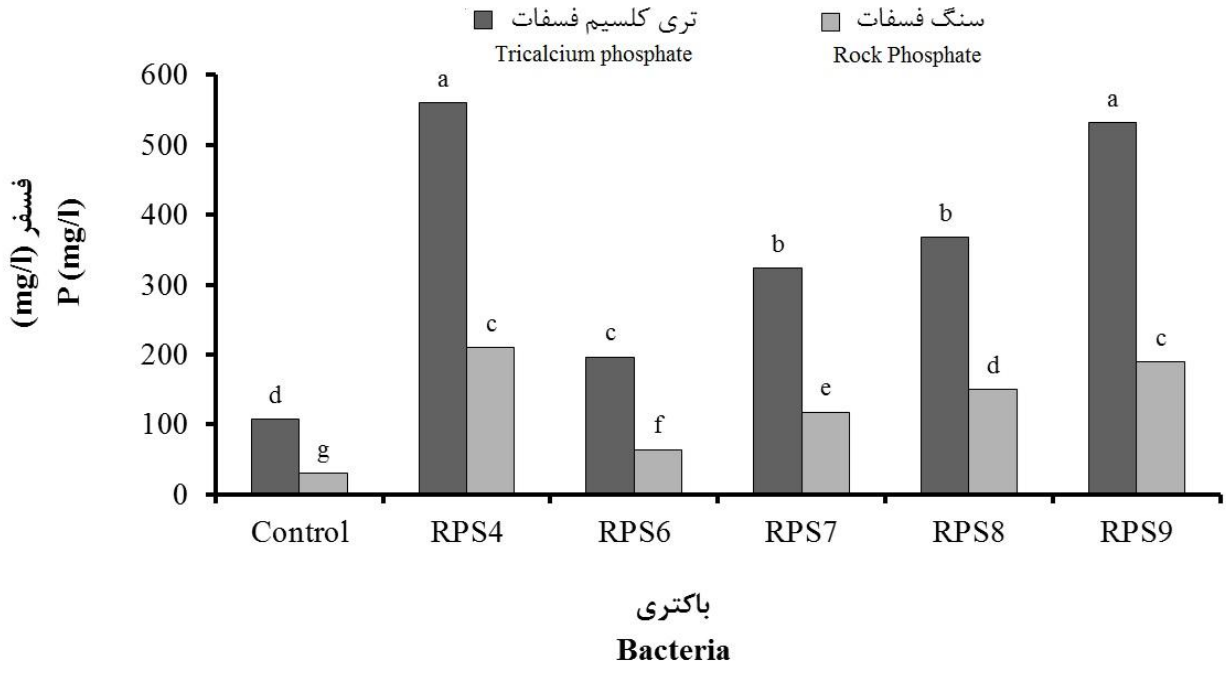
جدول۳- تجزیه واریانس توان حل‌کنندگی فسفات نامحلول توسط باکتری‌های بکار رفته در کودهای میکروبی

Table 3- Analysis of variance of insoluble phosphate dissolution capacity by bacteria used in microbial fertilizers

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares
باکتری Bacteria	5	162964.153**
منبع فسفات Source of phosphate	1	2647199.702**
باکتری * منبع فسفات Bacteria * Phosphate	5	59049.316**
خطا Error	24	469.802
ضریب تغییرات (٪) (٪) Coefficient of variation	18.50	

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد (۰۱/ ۰>*P*)

** Significant at 1% level (*P* <0.01)



شکل ٤- مقایسات میانگین توان انحلال فسفات معدنی نامحلول جدایه‌ها در محیط اسپربر مایع

Figure 4- Mean comparisons of insoluble inorganic phosphate dissolution capacity of isolates in liquid Sperber medium

در پژوهشی چهار نوع کود زیستی رایج در کشور 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 ۶۰۶/۴ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین توان انحلال فسفر بود. توان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های ذکر شده به روش کمی در محدوده ۷۷/۱۵-۶۰۶/۴ میلی گرم بر لیتر بود (۹). سلطانی و همکاران (۲۵) با بررسی ۹۰ نمونه خاک ریزوسفری گندم، تعداد ۲۵ جدایه *Pseudomonas* و ۴۴ جدایه *Flavobacterium* را جداسازی و خالص نمودند. بنا به گزارش آن‌ها، توانایی حل‌کنندگی فسفات این جدایه‌ها در محیط کشت اسپربر، با استفاده از منبع تری‌کلسیم فسفات و بعد از ۱۲۰ ساعت از ۱۲۹/۹ تا

۳۸۶/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود.

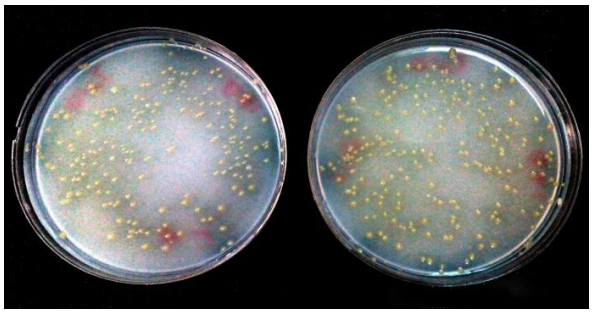
بررسی زنده‌مانی باکتری‌ها در کود میکروبی

با توجه به این‌که کود میکروبی تهیه شده به دو صورت مورد شمارش میکروبی قرار گرفت لذا نتایج بخش تیمار دمایی کودهای میکروبی فسفاتی نشان داد که از میان باکتری‌های مورد آزمایش، فقط باکتری‌های RPS9 و RPS7 در اثر تیمار دمایی زنده ماندند. در بخش دمای معمولی جدول تجزیه واریانس بررسی تعداد جمعیت میکروبی فعال و نیز زندمانی باکتری‌ها در زمان‌های صفر، دو ماه، چهار ماه و شش ماه پس از تلقیح، در محیط اسپربر نشان داد که اثر زمان بر روی زنده‌مانی باکتری‌های بکاررفته در کودهای میکروبی بین زمان‌های مورد نظر کاملاً معنی‌دار می‌باشد (جدول ۴). در شمارش جمعیت میکروبی اولیه (زمان صفر) در دمای معمولی، همه باکتری‌های بکاررفته در بسترهای میکروبی دارای جمعیت قابل قبولی بودند (شکل ۵)، در بررسی تعداد جمعیت میکروبی در بستر اولیه، باکتری‌های RPS4، RPS6، RPS7، RPS8 و RPS9 به ترتیب با جمعیت‌های ۳/۶، ۳/۵، ۳/۵، ۳/۷ و ۳/۵ ($\times 10^{6}$ CFU/g)، بعد از چهار ماه به ترتیب دارای جمعیت‌های ۴/۶، ۶/۳، ۹/۶، ۷/۴ و ۸/۶ ($\times 10^{5}$) و در ماه ششم دارای جمعیت‌های به ترتیب ۳/۹، ۳/۸، ۱۲/۳، ۷/۴ و ۹/۲ ($\times 10^{4}$) بودند که به نظر می‌رسد این مدت زنده‌مانی برای باکتری‌های مورد آزمایش مطلوب باشد (شکل ۶). در شمارش جمعیت فعال کودهای میکروبی تحت تیمار دمایی، نتایج نشان داد که جمعیت اولیه بستر میکروبی (در زمان صفر) افت ۱۰ برابری نسبت به بستر بدون تیمار دمایی داشته، به‌طوری‌که جمعیت فعال در کودهای میکروبی RPS9 و RPS7 (تیمارهای مقاوم به دما) در زمان صفر به‌ترتیب ۴/۵ و ۴/۳ ($\times 10^{5}$) بوده، در ماه چهارم به‌ترتیب دارای جمعیت ۱۲/۲ و ۸/۳ ($\times 10^{4}$) و در ماه ششم به‌ترتیب درارای جمعیت ۶/۵ و ۴/۳ ($\times 10^{3}$) بودند و علی رغم این‌که جمعیت میکروبی RPS9 و RPS7 در تیمارهای غیردمایی ۶ ماه قادر به زنده‌مانی می‌باشند ولی مشاهده گردید که در تیمارهای دمایی این زنده‌مانی عملاً به ۴ ماه کاهش می‌یابد (شکل ۷).

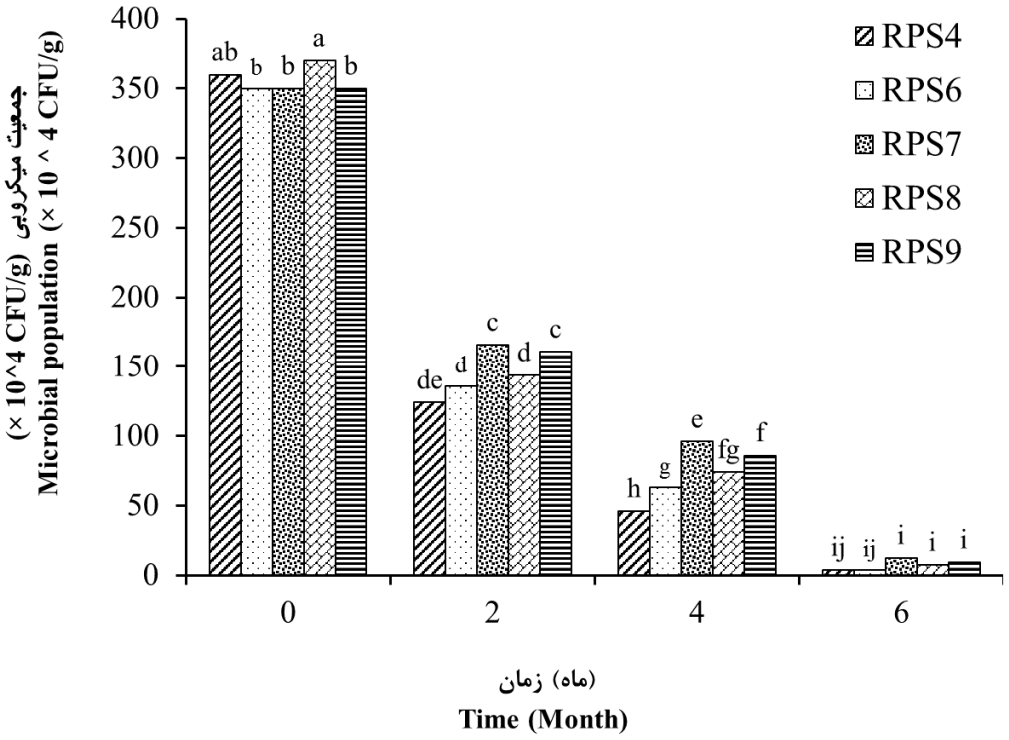
جدول٤- جدول تجزیه واریانس تعداد جمعیت میکروبی فعال و زنده‌مانی باکتری‌ها در زمان‌های صفر، دو ماه، چهار ماه و شش ماه پس از تلقیح
Table 4- Analysis of variance of active microbial populations and bacterial survival at zero, two, 4 and 6 months after inoculation

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares
باکتری Bacteria	4	719.007**
زمان Time	3	232400.097**
باکتری * زمان Bacteria * Time	12	280.450**
خطا Error	20	3.835
ضریب تغییرات (٪) (٪) Coefficient of variation	11.59	

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد ($P<0.01$)
** Significant at 1% level ($P<0.01$)

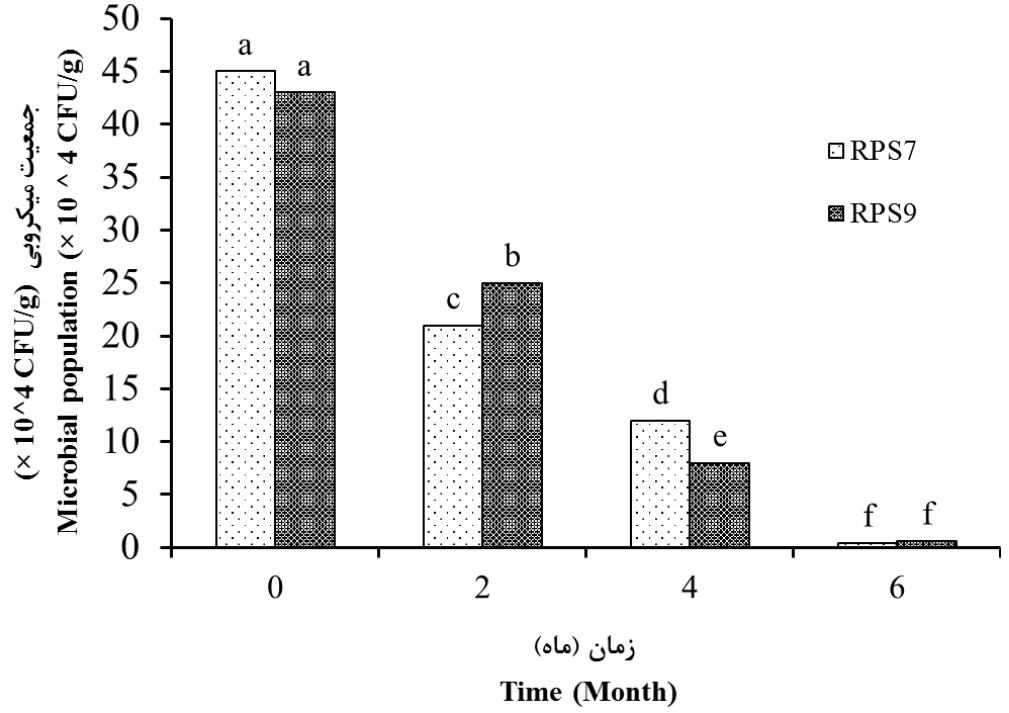


شکل ٥- جمعیت میکروبی مورد شمارش در کودهای میکروبی
Figure 5- Counting of microbial population in microbial fertilizers



شکل ٦- زنده‌مانی و شمارش جمعیت باکتری در کودهای میکروبی (بدون اعمال تیمار دمایی) در زمان‌های مختلف

Figure 6 - Viability and population counting of bacteria in microbial fertilizers (stored at room temperature, without temperature treatment) at different times



شکل ۷- زنده‌مانی و شمارش جمعیت میکروبی در کودهای میکروبی (با اعمال تیمار دمایی) در زمان‌های مختلف

Figure 7 - Viability and population counting of bacteria in microbial fertilizers (by applying temperature treatment) at different times

لذا بایستی توجه شود که باکتری‌های مقاوم به دما با وجود این‌که در تیمار غیردمایی دارای زنده‌مانی قابل قبولی می‌باشند ولی جمعیت آن‌ها در اثر تیمار دمایی (در مرحله خشک کردن گرانول‌های کود میکروبی) بعد از چند ماه (۴ ماه) به زیر حالت استاندارد می‌رسد.

نتایج شناسایی

نتایج شناسایی مولکولی باکتری‌ها به روش 16S rRNA نشان داد که هر دو باکتری مقاوم به دما (RPS7 و RPS9) متعلق به جنس *Pantoea* هستند. برای شناسایی گونه این باکتری‌ها از رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی استفاده گردید (جدول ۵ و ۶). نتیجه شناسایی یک باکتری جدا شده از ورمی‌کمپوست که توان حل‌کنندگی فسفات کم‌محلول از منبع تری‌کلسیم فسفات را داشت مشخص کرد که این باکتری متعلق به *Bacillus flexus* می‌باشد (۱۹).

جدول ۵- رنگ امیزی گِرم جدایه‌ها
Table 5- Gram stain of isolates

ایزوله Isolate	نوع گرم Gram type	شکل و اندازه Shape and size
RPS7	گرم منفی	کوکسی تا میله‌ای ریز
RPS9	گرم منفی	کوکسی تا میله‌ای ریز

جدول ٦- نتایج شناسایی بیوشیمیایی ایزوله‌های میکروبی بکار رفته در کودهای میکروبی
Table 6- Results of biochemical identification of microbial isolates used in microbial fertilizers

ایزوله Isolate	اکسیداز Oxidase	کاتالاز Catalase	نیترات ردکتاز Nitrate reductase
RPS7	−	+	+
RPS9	−	+	+

نتیجه نهایی شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی باکتری‌ها در جدول ۷ آورده شده است.

جدول ۷- نتایج شناسایی نهایی ایزوله‌های میکروبی بکار رفته در کودهای میکروبی
Table 7 - Final results of identification of microbial isolates used in microbial fertilizers

ایزوله Isolate	نتیجه شناسایی Identification result
RPS7	*Pantoea agglomerans* RPS7
RPS9	*Pantoea agglomerans* RPS9

نتیجه‌گیری

این آزمایش با هدف بررسی توانایی باکتری‌های بکاررفته در کودهای میکروبی از نظر انحلال فسفر کم محلول (بصورت نیمه‌کمی و کمی) در دو محیط کشت با منابع مختلف فسفر، شمارش جمعیت میکروبی و بررسی زنده‌مانی باکتری‌ها در مدت زمان صفر، دو ماه، چهار ماه 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 اولاً تفاوت معنی‌داری بین منابع مختلف فسفر توسط باکتری‌های حل کننده وجود دارد و انحلال بیشتر فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات در مقایسه با سنگ فسفات به دست آمد. ثانیاً دو روش انجام گرفته برای بررسی توانایی انحلال فسفر کم‌محلول (روش کمی و نیمه کمی) دارای نتایج مشابهی بودند. بطوری‌که در هر دو آزمایش باکتری‌های RPS4 و RPS9 از نظر انحلال فسفر دارای مقادیر بالایی نسبت به سایر باکتری‌ها و تیمار کنترل (شاهد) بودند. در شمارش جمعیت میکروبی و بررسی زنده‌مانی باکتری‌ها، نتایج بخش تیمار دمایی کودهای میکروبی فسفاتی نشان داد که از میان باکتری‌های مورد آزمایش، فقط باکتری‌های RPS9 و RPS7 قادر به تحمل تیمار دمایی اعمال شده بودند و در این شرایط زنده ماندند. در شمارش جمعیت میکروبی اولیه (زمان صفر) در دمای معمولی، همه باکتری‌های بکار رفته در بسترهای میکروبی دارای جمعیت قابل قبولی بودند و نتایج نشان داد که همه باکتری‌های مورد آزمایش بعد از چهارماه دارای جمعیتی معادل 10^5 و در ماه ششم دارای جمعیت

10^4 بودند که بنظر می‌رسد این مدت زنده‌مانی برای باکتری‌های مورد آزمایش مطلوب می‌باشد. در شمارش جمعیت میکروبی فعال کودهای میکروبی تحت تیمار دمایی، نتایج نشان داد که جمعیت اولیه بستر میکروبی (در زمان صفر) کاهش ۱۰ برابری نسبت به بستر بدون تیمار دمایی داشته و علی‌رغم این‌که جمعیت میکروبی RPS9 و RPS7 در تیمارهای بدون اعمال تیمار دمایی، ۶ ماه قادر به زنده‌مانی می‌باشند ولی مشاهده گردید که در تیمارهای دمایی این زنده‌مانی عملاً به ۴ ماه کاهش می‌یابد. لذا باکتری‌های RPS9 و RPS7 با وجود این‌که در شرایط عادی دارای زنده‌مانی قابل قبولی می‌باشند ولی در اثر تیمار دمایی جمعیتشان بعد از ۴ ماه به زیر حالت استاندارد می‌رسد که در مرحله دمایی گرانوله کردن کود میکروبی باید به این نکته توجه کرد.

با وجود اینکه تیمار RPS4 دارای بالاترین قدرت حل‌کنندگی بود ولی چون تحمل دمایی ندارد، لذا استفاده از این باکتری در این فرمولاسیون مناسب نیست زیرا ماندگاری و بقاء باکتری نامناسب است. با توجه به یافته‌های این تحقیق استفاده از باکتری حل‌کننده فسفات و مقاوم به دما RPS9 *Pantoea agglomerans* که به تازگی جداسازی و شناسایی شده است برای تولید کود میکروبی گرانوله در صنعت می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. البته ناگفته نماند که آزمایش‌های بیشتری در خصوص اثربخشی این فرمولاسیون با استفاده از این باکتری‌ها در کشت‌های گیاهی بایستی انجام گیرد تا بتوان در مورد بکارگیری این باکتری‌ها در کود میکروبی تصمیم گرفت.

منابع

1- Aliasgharzad N. 1997. Microbiology and soil biochemistry (translation). First Edition. Tabriz University Press.

2- Bashan Y., Kamnev A.A., de Bashan L.E. 2013. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. Biology and Fertility of Soils, 49:1–2

3- Fageria N.K. 2009. The use of nutrients in crop plants.CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.USA. New York.

4- Goldstein A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical prospective and future prospects. American Journal of Alternative Agriculture, 1: 51-57.

5- Heydarian Z., and Sarikhani M.R. 1390. 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.

6- Khan M.S., Zaidi A., and Wani P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. Agronomy for Sustainable Development, 27: 29-43

7- Khoshru B. Sarikhani, M.R., and Ebrahimi M. 2017. Isolation of temperature resistant phosphate solubilizing bacteria for use in phosphatic microbial fertilizer. The 15th Congress of Soil Science. 6-8 September. Isfahan. Iran

8- Khoshru B., Sarikhani, M.R., and Aliasgharzad N. 2017. Application and Non-Application of Sulfur in the Formulation of *Pseudomonas fluorescens* Phosphatic Microbial Fertilizer on Corn (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural Sciences and Sustainable Production, 27(3):119-136

9- Khoshru B., Sarikhani, M.R., 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

10- Khoshru B., Sarikhani, M.R., 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

11- Malboobi M.A., Owlia P., Behbahani M., Sarokhani E., Moradi S., Yakhchali B., Deljou A., and Morabbi Heravi K. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. The World Journal of Microbiology & Biotechnology, 25: 1471-1477

12- Matthews S., and Adzahar M.S. 2016. Application of phosphate solubilising microorganisms to increase the solubilisation of rock phosphates in soil. Journal of Tropical Agriculture and Food Science, 44(1), pp.9-18.

13- Motsara M.R., and Roy R.N. 2008. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. Rome.

14- Nazery P., Kashani A., Khavazi K., and ardekani M.R. 2010. the effect of microbial bio-fertilizers containing phosphorus on the quantity and quality of white beans. National Conference of Water, Soil, Plant Science & Agricultural Machinery in IAU Dezful Branch.

15- Nobahar A., Sarikhani M.R., and Chalabianlou N. 2017. Buffering Capacity Affects Phosphorous Solubilization Assays in Rhizobacteria. Rhizosphere, 4: 119-125

16- 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

17- Paul E.A. 2007. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. 3ed Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier.

18- Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., and Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growthpromoting bacteria. Plant Soil, 287: 15-21.
19- Saikrithika S., Krishnaswamy V.G., 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), pp.526-535.
20- 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.
21- Sarikhani M.R., 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.
22- Selvi K.B., Paul J.J.A., Vijaya V., and Saraswathi K. 2017. Analyzing the Efficacy of Phosphate Solubilizing Microorganisms by Enrichment Culture Techniques. Biochemistry & Molecular Biology Journal.
23- Shakeela S., Padder S.A., and Bhat Z.A, 2017. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with medicinal plant *Picrorhiza Kurroa*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(3), p.157.
24- Son H.J., Park G.T., Cha M.S., and Heo M.S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novelsalt- and pH-tolerant Pantoea agglomerans R-42 isolated from soybean rhizosphere. Bioresource Technology, 97: 204-210.
25- Soltani E.A., 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.
26- Sperber J.I. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research, 9: 782-787.
27- Zhang J., Wang P., Fang L., Zhang Q.A., 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), pp.57-65.

Journal of Water and Soil
Vol. 32, No. 1, Mar.-Apr. 2018, p. 155-167

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۱، فروردین –اردیبهشت ۱۳۹۷، ص. ۱۶۷-۱۵۵

Isolation and Identification of Temperature Resistant Phosphate Solubilizing Bacteria for Use in Phosphatic Microbial Fertilizer

B. Khoshru[1] - M.R. Sarikhani[2*]

Received: 10-10-2017
Accepted: 17-01-2018

Introduction: Application of chemical and organic carrier and its integration with useful microorganisms including phosphate solubilizing bacteria (PSB) has facilitatedproduction of phosphate microbial fertilizers (PMFs), which are used in granular or powder form. One of the major limitation of thesebiofertilizers is decline or loss of PSB viable cell in the granule preparation process. Accordingly, in this study, isolation of temperature resistant phosphate solubilizing bacteria was performed and temperature tolerance and ability to dissolve phosphate from rock phosphate (RP) and tricalcium phosphate (TCP) sources were evaluated.

Materials and Methods: Firstly, each soil samples incubated for 16 hours at 55 °C, then dilution series were prepared and 100 µl of four final dilutions (10-6, 10-7, 10-8, and 10-9) were used to spread on Sperber solid medium. After spreading the microbial suspensions from the dilutions in the Sperber solid culture medium and the appearance of colonies, screening based on the resistance to soil temperature treatment and, subsequently, the ability to grow in a solid Sperber solid medium and dissolution of low solubility phosphate (formation of transparent halo), was done to isolate PSB. In order toprepare PMF, each of screened PSB were cultured in NB, andthen 1 ml of overnight culture wasmixed with 9 ml sterile distilled water and added to the basal formulation of rock phosphate (45 g), bagasse (30 g) and sulfur (15 g) with initial temperature of20°C.Temperature treatments (55 °C for 16 hours) of bacteria were performed in three steps: a) on sampled soils, b) pure-culture of bacteria and c) bacteria added to the carrier. Microbial population in provided microbial fertilizer was countedin two ways a) half of the microbial fertilizer was kept at normal temperature by maintaining the initial conditions, b) another half after the temperature applied (55 ° C for 16 hours). The semi-quantitative and quantitative test of insoluble inorganic phosphate solubility was performed by isolates in solid and liquid Sperber medium. The 16S rRNA molecular method was used to identify the isolated bacteria by general primers 27F and 1492R.

Results and Discussion: Five bacteria (RPS4, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9) out of nine isolated bacteria were able to solubilize mineral phosphate (TCP and RP) but only two isolates (RPS7 and RPS9) were resistant to temperature (55 °C for 16 h). In tricalcium phosphate medium, the RPS9 and RPS7 bacteria had a high ability to solubilize insoluble inorganic phosphate with average of 2.60 and 2.27 for a ratio of (HD / CD) after 12 days, respectively. There was no halo in Sperber medium containing rock phosphate. The amount of solution in the quantitative methods was also obtained to be 563.8 and 324.1 mg / l for RPS9 and RPS7 bacteria, respectively. The prepared microbial fertilizer was counted in two ways (a): half of the sample fertilizer was kept at normal temperature by maintaining the initial conditions; (b):after the maintaining temperature at 55 °C for 16 hours, the population of other half was determined. During counting the initial microbial population (zero time) at normal temperature, all bacteria used in microbial carrier had an acceptable population. During examining the populationsof microbial in the initial carrier, RPS4, RPS6, RPS7, RPS8 and RPS9 bacteria were 3.6, 3.5, 3.6, 3.5, 3.6 and 3.5 (×106 CFU/g), respectively. After 4 months the populations were 4.6, 6.3, 9.6, 7.4 and 8.6 (×105) and in the 6th month, the populations were 3.9, 3.8, 12.3, 4. 7 and 9.2 (×104) seeming to be favorable for the tested bacteria. It seems that this survival time for the tested bacteria is desirable. During countingactive population of temperature treated microbial fertilizers, the initial population of the microbial carrier (at zero time) decreased 10 times with respect to the non-treated carrier. Active population ofRPS9 and RPS7 (temperature-resistant treatments) in the zero time was 4.5 and 4.3 (×105), respectively. Although the RPS9 and RPS7 microbial populations were able to survive in non- temperature treatments for 6 months, it was observed that in the treatment, this viability practically reduced to 4 months. Molecular identification of the isolates RPS7 and RPS9 revealed that they belonged to Pantoeaagglomerans .

1 and 2- PhD Student and Associate Professor of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
(*-Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com)

Conclusions: According to the findings of this research, using phosphate solubilizing bacteria and temperature resistant Pantoea agglomerans RPS9, recently isolated and identified, can be considered to industrially produce granular microbial fertilizers. It is worth mentioning that further studies are required to be carried out on the effectiveness of this formulation with these bacteria in farms.

Keywords: Formulation of microbial fertilizers, PGPR, Thermal tolerance, Viability