Archive of SID

نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد ۲۹ شماره ۳ / پاییز ۱۳۹۸

بررسی زنده‌مانی باکتری *Enterobacter cloacae* در چند حامل جامد و اثر زادمایه‌های تهیه شده بر جوانه‌زنی و رشد گندم

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

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۸

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

چکیده

در کشاورزی پایدار کودهای زیستی جایگاه ویژه‌ای دارند. به همین خاطر برای عرضه آن‌ها از حامل‌های مختلف برای حفظ ماندگاری و زنده‌مانی باکتری استفاده می‌شود. این تحقیق با هدف بررسی زنده‌مانی باکتری *Enterobacter cloacae* بر روی حامل‌های مختلف جامد در مدت یک سال صورت گرفت. حامل‌های جامد، شامل ۱۰ تیمار باگاس، پیت، هیدروچار، بیوچار، خاکاره و پرلیت به‌صورت منفرد و مخلوط آن‌ها با پرلیت با نسبت وزنی (۱:۱) بودند. در این بررسی، زادمایه‌های باکتریایی تهیه شده با جمعیت اولیه یکسان (10^9CFU/g) پس از نگهداری در دمای اتاق از نظر توان ماندگاری و زنده‌مانی باکتری مورد مقایسه قرار گرفتند. جمعیت باکتری در زمان‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۷۰و ۳۶۵ روز شمارش شد. برای شمارش باکتری‌های زنده در حامل‌های میکروبی، بعد از تهیه سری‌های رقت از روش شمارش در کشت نواری درون یک پلیت استفاده شد. در این تحقیق اثرات زادمایه‌های تهیه شده بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم در شرایط استریل و به روش کشت در پلیت شیشه‌ای، در پایان ماه چهارم بررسی شد. در این دو روش خصوصیاتی از قبیل طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه و وزن تر و خشک کل ساقه و ریشه اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از شمارش باکتری‌ها نشان داد که از میان حامل‌های مورد آزمایش، بیشترین جمعیت شمارش شده بعد از گذشت یک سال در حامل باگاس (10^9 CFU/g) و کمترین جمعیت شمارش شده در خاکاره به دست آمد بطوریکه بعد از گذشت ۶ ماه هیچ جمعیت زنده باکتری در خاکاره شمارش نشد. همچنین نتایج حاصل از تست جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم نشان داد که زادمایه‌های هیدروچار و باگاس+ پرلیت در کشت پلیت نتایج تکرارپذیری داشتند و در هر دو حالت در اغلب ویژگی‌های اندازه‌گیری شده، میانگین‌های بهتری را به خود اختصاص داده بودند. در پایان با توجه به نتایج این آزمایش و راحتی و در دسترس بودن حامل‌های مورد استفاده، حامل باگاس+ پرلیت توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کودهای زیستی، حامل جامد، *انتروباکتر کلوآسه*، زنده‌مانی باکتری، گندم

www.SID.ir

Archive of SID

Study the Survival of *Enterobacter cloacae* Bacteria in Several Solid Carriers and Effect of Prepared Inoculants on Ggermination and Growth of Wheat

Fatemeh Ghasemi Piranlo[1], Mohammad Reza Sarikhani[2*], Nosrat Allah Najafi[3]

Received: December 10, 2018 Accepted: May 8, 2019
1-MSc Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
2-Assoc. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
3-Assoc. Prof. of Soil Chemistry and Fertility, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
*Corresponding Author, Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

Biofertilizers play major role in sustainable agriculture. Therefore, to provide them, different carriers are used to increase the longevity and survival of the bacteria. The aim of this study was to investigate the survival of *Enterobacter cloacae* bacteria on different solid carriers during one year. Solid carriers consist of 10 treatments of bagasse, peat, hydrochar, biochar, sawdust and perlite as a single treatment and mixed with perlite (in a ratio of 1:1). In this study, bacterial inoculants prepared with the initial population (10^9 CFU/g) after storage at room temperature were compared for the survival of the bacteria. The bacterial population was counted at 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 270 and 365 days. For counting the bacteria in microbial carriers, after dilution series preparation, bacterial suspension was used in strip culture in a plate. In this research, the effects of prepared inoculants on germination and growth of wheat seedlings in sterile conditions in a plate culture at the end of the fourth month were investigated. In these method, characteristics such as shoot and root length, the wet and dry weight of shoot and root, total wet and dry weight of shoot and root were measured.The results of bacterial count showed that among the tested carriers, the most population counted after one year in bagasse carrier (10^9 CFU/g) and the lowest population was counted in the sawdust, so that after 6 months no alive cells of bacteria were counted in sawdust. Also, the results of germination test and growth wheat seedling growth showed that in most of the measured characteristics the hydrochar and bagasse + perlite in both plate experiment, had reproducible results and they had better means. Concluding, according to the results of this experiment and the convenience and availability of the carriers, bagasse + perlite carrier had the best results in increasing the survival of the bacteria and we suggest this kind of carrier.

Keywords: Bacterial survival, Biofertilizers, *Enterobacter cloacae*, Solid Carrier, Wheat

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه بروز مشکلات اقتصادی و زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی و نیز توجه به قابلیت‌های ذاتی بسیار جالب و متنوع موجودات خاکزی و به ویژه میکروارگانیسم‌ها موجب گردیده که یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین زمینه‌های مورد تحقیق، تلاش برای تولید کودهای زیستی باشد (لیچ و مامفورد، ۲۰۰۸). کودهای زیستی به موادی اطلاق می‌شود که شامل یک یا چند میکروارگانیسم با جمعیت مناسب، به همراه مواد نگهدارنده یا متابولیت‌های تولیدی آن‌ها می‌باشد (اگامبردیوا، ۲۰۰٤). برای حفظ جمعیت مشخصی از باکتری‌های مورد نظر در کودهای زیستی برای مدت معین، از موادی به نام حامل استفاده می‌شود که باید قادر به حفظ جمعیت مشخص و قابل قبولی از باکتری مورد نظر در مدت معین باشد. بنابراین مهم‌ترین ویژگی یک حامل توانایی حفظ جمعیت مناسبی از باکتری در فاصله زمانی تولید تا مصرف آن می‌باشد. یک حامل میکروبی مناسب باید دارای ویژگی‌های لازم برای حمایت از سلول‌های زنده در شرایط فیزیولوژیکی مطلوب در یک بازه زمانی مناسب باشد و همچنین اثرات جانبی منفی بر باکتری‌ها نداشته باشد (استنفز و راسک، ۲۰۰۰). به طور کلی ویژگی‌های یک حامل برتر شامل این موارد می‌باشد: ۱- برای سویه باکتری و گیاه غیرسمی باشد؛ ۲- ظرفیت نگهداری رطوبت بالایی داشته باشد؛ ۳- به آسانی بتوان آن را با اتوکلاو یا پرتو گاما استریل نمود؛ ٤- به مقدار کافی موجود و در دسترس باشد؛ ٥- ارزان و به‌صرفه باشد؛ ٦- به خوبی به بذر گیاهان بچسبد؛ pH =۷ خنثی یا قابل تنظیم داشته باشد؛ ۸- قادر به حمایت از رشد باکتری باشد و زنده‌مانی آن را تضمین نماید؛ ۹- به انتشار سریع باکتری‌ها در خاک کمک نماید؛ ۱۰- حالت کلوخه‌ای نداشته باشد (اسمیت و همکاران، ۱۹۹۲).

حامل باکتری می‌تواند به صورت جامد یا مایع باشد که هر یک دارای مزایا و معایبی است. با توجه به اینکه حمل و نقل و استفاده از باکتری‌های تکثیر شده به شکل مایع دشوار است، باکتری‌ها را روی یک سری حامل جامد قرار می‌دهند. با بررسی منابعی که انجام شده است طیف وسیعی از مواد به عنوان حامل‌های جامد مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. در بسیاری از کشورهای پیشرفته مانند آمریکا، کانادا، روسیه و استرالیا از پیت به عنوان حامل استفاده می‌شود که متأسفانه در ایران معادن قابل بهره‌برداری ندارد (خاورزی و رجالی، ۲۰۰۰). هر چند پیت در درجه اول، به دلیل نتایج موفقیت‌آمیز به دست آمده از کشت تجاری محبوبیت بسیاری داشت اما مشکلاتی نیز داشت از جمله تنوع در کیفیت که وابسته به منبع تهیه آن بود، همچنین در فرآیند استریل کردن با بخار آب (اتوکلاو)، برخی ترکیبات سمی برای باکتری آزاد می‌شد (چائو و الکساندر، ۱۹۸٤) و از طرف دیگر، دسترسی آن در بسیاری از کشورها محدود است. برخی از انواع پیت‌ها می‌توانند حتی رشد گیاه را کاهش دهند (هوبر و همکاران، ۱۹۸۹) و همچنین آن‌ها اغلب مستعد آلودگی هستند که می‌توانند عمر مفید باکتری را کاهش دهند (فاگس، ۱۹۹۲). بیشتر ذخایر پیت، pH پایین دارند که باید با آهک برای رسیدن به pH ۷- ٦/٥ اصلاح شود (روقلی، ۱۹۷٦). تنوع زیاد در کیفیت و ترکیب حامل‌های مختلف با پیت تا حد زیادی کیفیت محصول نهایی زادمایه تولیدی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث مشکلاتی در جمعیت باکتری و شرایط ذخیره‌سازی شده (وان السا‌س و همکاران، ۱۹۹۰) و پاسخ‌های گوناگونی از اثربخشی آن‌ها مشاهده شده است (باشان، ۱۹۹۸). مشهدی اصغری و علی اصغرزاد (۲۰۰٤) جهت مقایسه کارایی چند ماده نگهدارنده باکتری *سینوریزوبیوم ملیلوتی* برای تولید مایه تلقیح یونجه، از بین حامل‌های مورد آزمایش که شامل پیت، ورمی‌کمپوست، لجن بیولوژیک پتروشیمی (BFW)، ورمیکولایت+ ورمی‌کمپوست (۱:۱)، ورمیکولیت+ BFW (۱:۱) بود، گزارش نمودند که مخلوط‌های ورمیکولایت+ BWF (۱:۱) و ورمیکولایت+ ورمی‌کمپوست (۱:۱) ضمن

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری باکتری به ترتیب به مدت چهار ماه و سه ماه، به عنوان حامل‌های نسبتاً مناسب برای تولید مایه تلقیح یونجه می‌باشند. همه این عوامل محققان را مجبور کرده است تا از سایر منابع ارزان‌قیمت و فراوان داخلی با حداکثر صفات مربوط به یک حامل خوب استفاده کنند. به همین خاطر ضرورت استفاده از منابع جدید و جایگزین به عنوان حامل جامد در تحقیقات مختلف مورد توجه قرار گرفت. هدف این تحقیق مقایسه حامل‌های جامد از نظر زنده‌مانی، جهت انتخاب بهترین ماده و ترکیب مورد استفاده از میان حامل‌های به کار گرفته شده می‌باشد. شرط اصلی تحقق این امر آن است که حامل معرفی شده بتواند جمعیت قابل قبول و مطابق استاندارد ملی یا جهانی (حداقل 10^6 باکتری در هر گرم از ماده حامل پس از شش ماه از تولید) را برای باکتری تأمین نماید (باشان، ۱۹۹۸).

مواد و روش‌ها

انتخاب باکتری

باکتری مورد استفاده در این تحقیق باکتری *انتروباکتر کلوآسه* می‌باشد که از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تأمین شده است. این باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل از خانواده انتروباکتریاسه است. *انتروباکتر* با توجه به توان انحلال فسفر، آزادسازی پتاسیم و توان رشد در محیط فاقد نیتروژن (قدرت تثبیت نیتروژن) به عنوان باکتری محرک رشد گیاه که اثرات مثبت آن در رشد گیاهان در آزمایشات پیشین مشخص شده بود (مرادی و ساریخانی، ۲۰۱۶؛ کاظمی اسکوئی و همکاران، ۲۰۱۷)، در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی زادمایه‌ها و بررسی جمعیت زنده باکتری در تیمارهای حامل

در این آزمایش از مواد حامل باگاس، پیت، هیدروچار، بیوچار، خاکاره و پرلیت به‌صورت منفرد و مخلوط آن‌ها با پرلیت با نسبت وزنی (۱:۱) استفاده گردید (جدول ۱). پیت از بقایای گیاهی نسبتاً تجزیه‌یافته حوالی دریاچه نئور استان اردبیل، باگاس و پرلیت به صورت فرآوری شده، خاکاره نیز از ضایعات چوب و هیدروچار و بیوچار نیز از چوب درخت تبریزی تهیه گردید. هیدروچار در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٤ ساعت و بیوچار در دمای ٤۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ دقیقه تهیه شده بودند (عظیم‌زاده و نجفی، ۲۰۱٦). حامل‌های مذکور پس از هوا خشک شدن، پودر شده و از غربال ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شدند. سپس برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن‌ها نظیر pH (نسبت ۱:۱۰)، EC (۱:۱۰)، پتاسیم قابل جذب (روش استات آمونیوم، pH= ۷)، فسفر قابل جذب (روش اولسن)، ماده آلی (روش والکلی و بلک)، عناصر آهن، مس و روی به وسیله دستگاه جذب اتمی و عنصر نیتروژن (روش کجلدال) اندازه‌گیری شد (پگ و همکاران، ۱۹۸۲).

جدول ۱- فرمولاسیون حامل‌های جامد

	حامل‌های جامد		نسبت‌های ۱:۱ (وزنی)
۱	باگاس	۷	باگاس+ پرلیت
۲	هیدروچار	۸	هیدروچار+ پرلیت
۳	خاک اره	۹	خاک اره+ پرلیت
٤	بیوچار	۱۰	بیوچار+ پرلیت
۵	پیت		
٦	پرلیت		

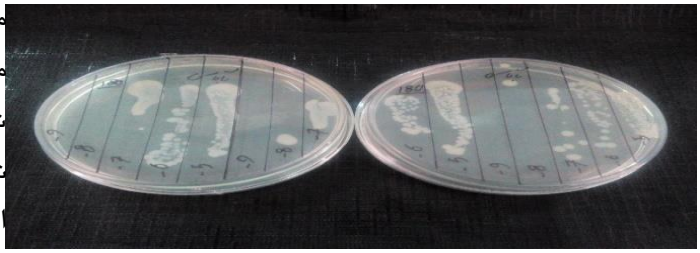
برای تهیه زادمایه‌های جامد، ابتدا ٦ گرم از هر ماده حامل (پیت، باگاس، خاکاره، هیدروچار، بیوچار و پرلیت) و نسبت‌های ۱:۱ از هر یک از حامل‌های مذکور با پرلیت (۳ گرم:۳ گرم) توزین شده و در کیسه‌های پلاستیکی (نایلون فریزر) مجزا ر۲یخته شدند. لازم به ذکر است که برخی از حامل‌ها برای داشتن pH خنثی، تعدیل pH شدند. این حامل‌ها مطابق (جدول ۱) شامل شماره‌های ۲، ٤، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ بودند. به دلیل پایین

www.SID.ir

Archive of SID

بودن pH هیدروچار، ٦ گرم از این ماده توسط ۰/٦ گرم کربنات کلسیم و ۳ گرم از این ماده توسط ۰/۳ گرم کربنات کلسیم تعدیل شدند. همچنین به دلیل بالا بودن pH پرلیت و بایوچار، این مواد نیز به ترتیب توسط ۰/۰۱ و ۰/۲ نرمال اسید سولفوریک تعدیل شدند (٦ گرم از بایوچار با ۳ میلی‌لیتر و ٦ گرم از پرلیت توسط ۳ میلی‌لیتر تعدیل شدند). pH بقیه حامل‌ها (نسبت‌های ۱:۱) با انجام محاسبات و با همان نسبت‌ها تعدیل گردیدند. سپس رطوبت حامل‌ها را به ۲۰٪ (حجمی) رسانده و درون اتوکلاو در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. بر اساس تعداد دفعات شمارش میکروبی، از هر حامل تهیه شد (۹ تکرار). کشت شبانه *انتروباکتر* در محیط NB برای تلقیح آماده شد و برای استقرار جمعیت اولیه $۱۰^{۹}$CFU/g، ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به هر کیسه اضافه گردید. زادمایه‌ها در دمای اتاق (^{o}C ۲۸-۲۱) و در تاریکی نگهداری شده و در زمان‌های مورد نظر شمارش شد.

شمارش باکتری به روش کشت نواری درون یک پلیت طبق شکل ۱ در زمان های ۰ ، ۱۵، ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۷۰ و ۳٦۵ روز انجام گرفت (ساریخانی، ۲۰۱٦)، بدین صورت که ۱۰g از حامل های داخل بسته ها در شرایط استریل برداشته شد و سری‌های رقت تهیه گردید. سپس سوسپانسون‌های حاصل روی محیط NA کشت شدند و بعد از ۲ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کلنی‌های موجود در پلیت ها شمارش شده و جمعیت باکتری در هر حامل تعیین گردید.



شکل ۱ - کشت نواری از سری‌های رقت تهیه شده در نمونه مورد آزمایش که رشد کلنی در مسیرهای کشت اتفاق می‌افتد.

اندازه‌گیری pH حامل‌ها

در این تحقیق برای بررسی اثرات pH بر زنده‌مانی باکتری همزمان با شمارش باکتری، pH حامل‌ها نیز اندازه‌گیری شد.

تست جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم

در این تحقیق اثرات زادمایه‌های تهیه شده حاوی *انتروباکتر کلوآسه* بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های بذر گندم در شرایط استریل و به روش کشت در پلیت شیشه‌ای بررسی شد.

در روش کشت در پلیت شیشه‌ای، برای هر تیمار ۱۰ عدد بذر در یک پلیت شیشه‌ای حاوی آب آگار در نظر گرفته شد (ساریخانی، ۲۰۱٦). پس از کشت، این تیمارها در دمای اتاق (^{o}C ۲۸-۲٦) زیر نور تکمیلی (نور مهتابی+ نور طبیعی) که به مدت ۱۳ ساعت در روز روشن بودند، به مدت یک هفته نگهداری شدند و پس از ظهور جوانه‌ها، درصد جوانه‌زنی محاسبه گردید. بدین منظوربذور سالم و یکنواخت گندم انتخاب و به منظور ضدعفونی در داخل هیپو کلریت سدیم ۰/۵ درصد (وایتکس ۱۰ بار رقیق شده) به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس با آب مقطر استریل پنج بار شستشو شدند. بذور ضدعفونی شده در زیر هود استریل و در کنار شعله به مدت یک ساعت درون فالکون‌های استریل در ۲ میلی‌لیتر از رقت $۱۰^{-۱}$ زادمایه‌ها قرار داده شدند. به منظور تلقیح بذور از زادمایه‌هایی استفاده شد که ٤ ماه از زمان تهیه آن می‌گذشت. سپس این بذور توسط پنس استریل به تعداد ۱۰ عدد در هر پلیت کشت گردیدند. بعد از کشت از رقت $۱۰^{-۱}$ هر زادمایه مقدار ۲ میلی‌لیتر با استفاده از سمپلر در پلیت شیشه‌ای در مجاورت بذور ریخته شد و در اتاقک رشد قرار داده شدند. مقدار آب مورد نیاز نیز بعد انجام کشت، افزوده شد. در روش کشت در پلیت شیشه‌ای، نمونه‌ها به دور از نور نگهداری شدند. در این مرحله برای حصول اطمینان بیشتر از زادمایه‌های تهیه شده و باکتری، پلیت استریل به عنوان شاهد (بدون تلقیح باکتری) و یک پلیت با تلقیح باکتری (بدون استفاده از مواد حامل) نیز کشت

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. در کشت پلیت شیشه‌ای بعد از گذشت سه روز دوباره در زیر هود استریل و در کنار شعله، ۲ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} هر تیمار به هر پلیت شیشه‌ای افزوده شد. در طول مدت رشد، مقدار آب مقطر استریل به اندازه مورد نیاز اضافه می‌شد. بعد از جوانه‌زنی بذور در کشت پلیت شیشه‌ای بعد از یک هفته گیاهچه‌ها از پلیت‌های حاوی آب آگار خارج گردیده و با احتیاط کامل شستشو شدند. سپس ارتفاع، وزن تر و خشک قسمت هوایی و ریشه محاسبه گردید.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

طرح آزمایشی مورد استفاده در شمارش باکتری به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایش عبارت بودند از: فاکتور اول شامل ۱۰ نوع حامل متفاوت و فاکتور دوم ۹ زمان شمارش بودند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج کشت گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن سه تکرار و محاسبه ضریب همبستگی و نتایج کشت در پلیت نیز با محاسبه درصد جوانه‌زنی و ضریب همبستگی انجام شد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و رسم نمودار با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

جدول ۲ نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف زمان و ماده حامل بر جمعیت باکتری ها در ۱۰ حامل را نشان میدهد. اثر اصلی و اثر متقابل تیمارها بر تعداد باکتری در سطح یک درصد معنی‌دار شد. شکل۲ اثر متقابل حامل‌ها در زمان را نشان می‌دهد که در این حامل‌ها در شمارش اولیه و بلافاصله بعد از افزودن سوسپانسیون باکتری به حامل، جمعیت باکتری در تمام حامل‌ها به غیر از بیوچار افزایش یافت ولی بعد از دو هفته نگهداری باکتری در دمای اتاق، تعداد باکتری به صورت معنی‌دار نسبت به شمارش اولیه کاهش یافت. علت کاهش باکتری در شمارش ۱۵ روز، احتمالاً به علت وارد شدن باکتری در محیط جدید، از طرف حامل‌های مختلف تنش‌های متفاوتی بر روی جمعیت باکتری وارد شده و باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار بین حامل‌ها گردیده است. نکته قابل تأمل در مورد تمام حامل‌ها، عدم وجود جمعیت اولیه یکسان می‌باشد. این نتیجه در شرایطی حاصل شده است که جمعیت برابری از باکتری به تمام حامل‌ها اضافه شده بود. این نتیجه حاکی از آن است که با افزودن باکتری به برخی از حامل‌ها، به باکتری تنش‌های لحظه‌ای و آنی وارد می‌شود که باعث نوسان جمعیت باکتری می‌شود.

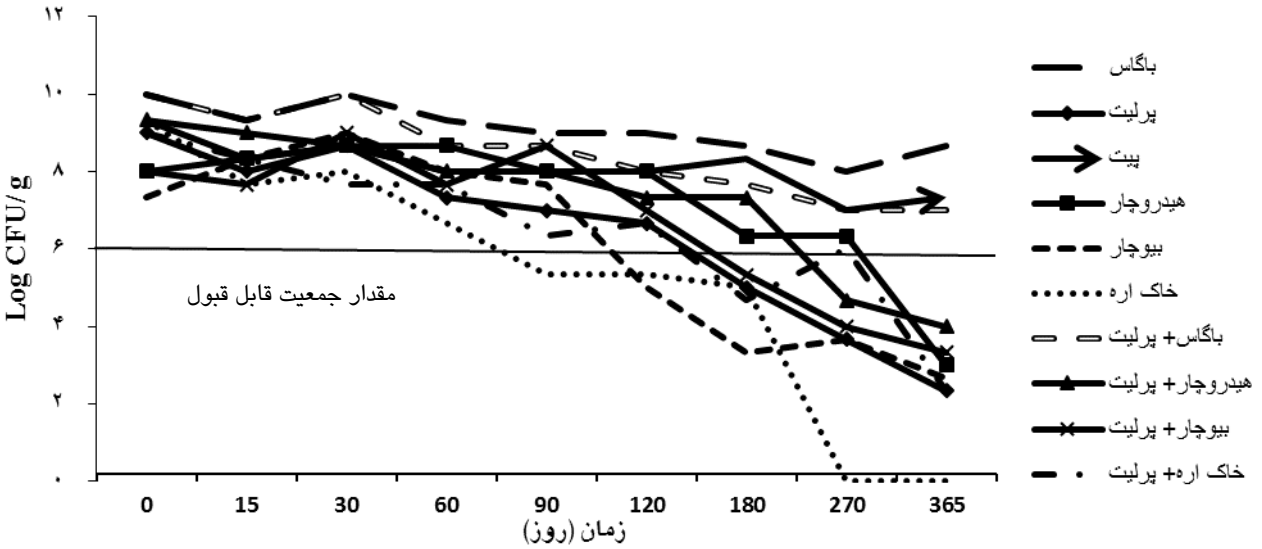
جدول ۲- تجزیه واریانس تعداد باکتری در حامل‌های مختلف در زمان‌های شمارش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
حامل	۹	۳۷/۱۲۰**
زمان	۸	۸۸/۵۲۰**
حامل × زمان	۷۲	۳/۳۰۱**
خطا	۱۸۰	۰/۲۸۹
ضریب تغییرات (٪)		۷/۵۳

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- روند زنده‌مانی باکتری در حامل‌های جامد در طول زمان

نتایج زنده‌مانی باکتری بر روی حامل‌ها در شکل ۲ نشان می‌دهد که از میان حامل‌ها، حامل‌های باگاس، باگاس+ پرلیت و پیت در مدت ۳۶۵ روز به ترتیب با جمعیت ۸/۷، ۷ و ۷/۳ بیشترین جمعیت زنده باکتری را دارا بودند. بقیه حامل‌ها از جمله هیدروچار، هیدروچار+ پرلیت، بیوچار+ پرلیت، خاک اره+ پرلیت، بیوچار و خاک‌اره به ترتیب توانستند تعداد باکتری را به مدت نه ماه،شش ماه، چهار ماه، چهار ماه، سه ماه، دو ماه بالاتر از 10^6 CFU/g (مقدار جمعیت قابل قبول) حفظ کنند. خط معیاری برای سنجش کارایی زنده مانی باکتری در زادمایه ها بوده است. چون جمعیت باکتری در حامل‌های مورد استفاده در حال نوسان بود، به همین دلیل مبنای مقدار قابل قبول جمعیت را 10^6 CFU/g در نظر گرفتیم. لازم به ذکر است، حامل‌هایی که جمعیت زنده باکتری را برای مدت کوتاهی حفظ می‌کنند، برای مصرف سریع و فوری و در مواقعی که فاصله محل تولید و مصرف کوتاه باشد، می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

در پایان آزمایش، مقایسه میانگین بین حامل‌ها نشان داد که در بین این ۹ حامل، باگاس و باگاس+ پرلیت دارای بیشترین تعداد باکتری در واحد جرم زادمایه در مقایسه با پیت بوده‌اند. خاکاره نیز دارای کمترین تعداد باکتری در واحد جرم زادمایه بود. بطوریکه جمعیت باکتری موجود در خاکاره بعد از گذشت شش ماه به شدت کاهش یافت، به طوریکه جمعیت صفر شد، دلیل این کاهش را در خواص فیزیکی و شیمیایی آن بایستی جستجو کرد. بقیه حامل‌ها دارای روند یکسانی بودند. پیت به دلیل داشتن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسب (ظرفیت نگهداری آب بالا، سطح ویژه بالا، هدایت الکتریکی پایین و ...)، اغلب برای تولید زادمایه *ریزوبیوم* در جهان برای چند دهه به عنوان یک حامل مناسب مورد تأیید بوده و در بسیاری از کشورهای پیشرفته مانند کانادا، آمریکا، روسیه و استرالیا به عنوان حامل استفاده می‌شود. به همین جهت از پیت به عنوان حامل استاندارد و مطلوب یاد شده و از آن برای مقایسه سایر حامل‌ها با آن استفاده شد (خاورزی و رجالی، ۲۰۰۰). در این تحقیق، باگاس به عنوان بهترین ماده حامل *انتروباکتر کلوآسه* تعیین شد زیرا علاوه بر آنکه کلیه مشخصات یک حامل مطلوب را داشت (جدول۳)، از یک ویژگی بسیار خوب نیز برخوردار بود. این ویژگی که حتی پیت‌های مرغوب نیز از این خاصیت برخوردار نمی‌باشند، عدم نیاز به

www.SID.ir

Archive of SID

تنظیم‌کننده‌های pH می‌باشد، چون در مورد پیت برای تعدیل pH از کربنات کلسیم استفاده می‌شود (خاورزی و رجالی، ۲۰۰۰). در این پژوهش تنظیم نکردن pH در پیت سبب شد که این ماده با تمام ویژگی‌های مناسب بعد از باگاس و باگاس+ پرلیت بیشترین جمعیت را داشته باشد (شکل۳). همچنین باگاس می‌تواند از نظر ویژگی‌های فیزیکی شرایط مطلوبی را برای زنده‌مانی باکتری فراهم نماید. باگاس دارای فیبر زیاد و ساختمان نرم بوده و ترکیب بسیار ارزان، ساده و بدون ضرر برای محیط می‌باشد، به طوری که می‌توان از آن در نگهداری باکتری‌های موثر در کنترل‌گرهای زیستی استفاده کرد (اولیا و همکاران، ۲۰۰۹). اولیا و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی زنده‌مانی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از حامل‌های پرلیت، باگاس، ذغال سنگ، پوست ذرت به صورت منفرد و مخلوط با نسبت‌های معینی از ترکیبات استفاده کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که ترکیب پرلیت و باگاس با نسبت وزنی (۲:۱) بهترین فرمولاسیون بوده است. اولیا و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی فرمول‌های مختلف حامل از نظر نگهداری باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* و *اروینیا هربیکولا* به عنوان عوامل کنترل‌گرهای زیستی، ترکیب‌های مختلفی از حامل‌ها را تهیه نمودند. این ترکیب شامل پیت، باگاس، پرلیت، پرلیت- باگاس، پرلیت- باگاس- ذغال، باگاس- ذغال و محیط کشت مایع LB با غلظت یک سوم بود. آن‌ها نتیجه گرفتند که از میان ترکیبات فوق، باگاس در دمای اتاق عملکرد بهتری داشته است.

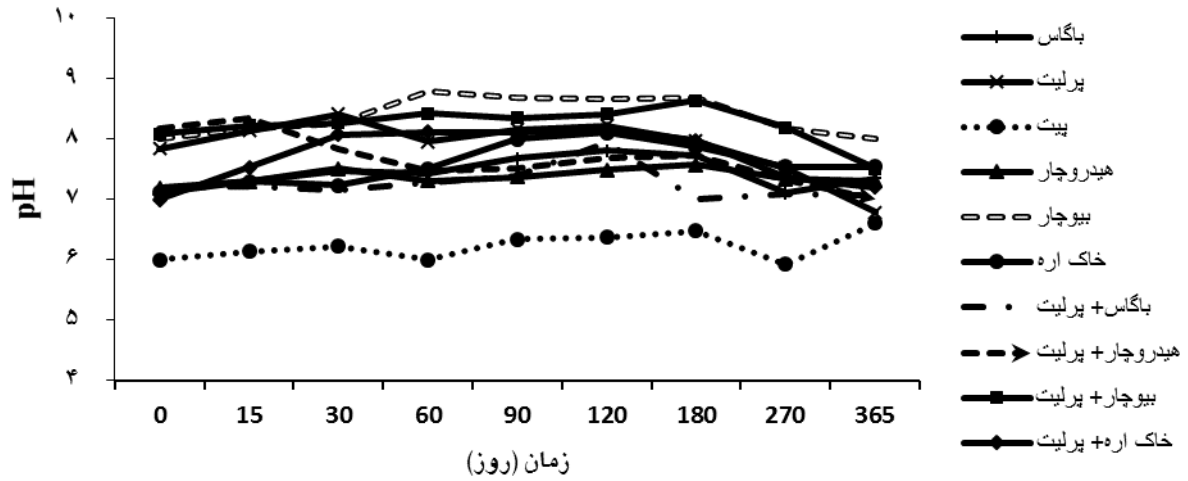
جدول ۳- برخی از خواص شیمیایی مواد انتخاب شده به عنوان حامل جامد

ویژگی‌های مورد نظر	نام ماده حامل					
	پیت	خاک اره	هیدروچار	بیوچار	باگاس	پرلیت
نیتروژن کل (٪)	۰/۱۰۶	۰/۰۸۱٤	۰/۰۵۸۸	۰/۰۱۸۲	۰/۱۲٦	۰
فسفر قابل جذب (٪)	۰/۰۰٤	۰/۰۳۲	۰/۰۲۵	۰/۰۱٤	۰/۰۱۰	۰/۰۰۱
پتاسیم قابل جذب (٪)	۰/۰٤۳	۰/۸٦۰	۰/۰۸۵	۰/۵۲۵	۰/۲۹۱	۰/۰۰۹
کربن آلی (٪)	۳۷/۰٦۵	۲۱/٦٦	۳۵/۷۸	۱٦/٤۱	۲٦/۱٦۵	۰
آهن* (mg/kg)	۱۹۳/۱٤۸	۱۷۱/۰۲۵	۱۱/٤٤٦	۷۲/۰۹۹	۱۵۷/۵۱۸	۳۲/٦۸۸
روی* (mg/kg)	۲۷/۱٤۳	۳۱۸/۷۹۸	۸٦/۸۹٦	۱٦٦/٤٤۳	۳٤/۱۰۷	۱۰/۵۲۵
مس* (mg/kg)	۲۵/۵۵٤	۳۳/۸۹۸	۵۵/۷۳۹	۲۳/٦٤۵	۱٦/۵۲۱	۱۰/۸٦٤
pH (۱:۱۰)	۵/۲٦	۸/۰۳	٤/۵٦۵	۱۱/۰۲۵	۷/۸۷	۹/۵۸۵
EC (dS/m) (۱:۱۰)	۰/۱٤٦	۰/۰۲۵	۰/۳٦۳	۰/۷۰۷	۰/۵۵۰	۰/۰۷٤
C/N	۳٤۹/٦۷	۲٦٦/۱	٦۰۸/۵	۹۰۱/٦	۲۰۷/٦۵	۰

* مقادیر Fe، Zn و Cu مقادیر کل می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- روند تغییرات pH در حامل‌های جامد در زمان‌های شمارش

در مورد هیدروچار می‌توان گفت که ویژگی‌های مطلوب آن (نگهداشت مطلوب رطوبت، بهبود تهویه) سبب شده که منجر به بهبود زنده‌مانی باکتری گردد (جدول۳) (بیت و همکاران، ۲۰۱۲؛ چن و همکاران، ۲۰۰۸؛ چون و همکاران۲۰۰٤؛ ریورا و همکاران، ۲۰۰۱). تأثیر بیوچار و هیدروچار بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها بستگی به مواد اولیه و شرایط فرآیند تولید دارد (محمد و همکاران، ۲۰۱٤؛ سالم و همکاران، ۲۰۱۳). از آنجا که هیدروچارها در دمای پایین (۲۰۰ درجه سانتیگراد) تولید می‌شوند، بنابراین برای تولید به انرژی کمتری نیاز دارد و همچنین دارای بازدهی بالاتر و توانایی جذب بهتر می‌باشند. با این حال، اسیدیته پایین آن می‌تواند نگران‌کننده باشد که با تعدیل pH می‌توان این مشکل را برطرف نمود. در این تحقیق نیز pH هیدروچار با کربنات کلسیم بر روی ۷ تعدیل شد. روند تغییرات pH در شکل ۳ نشان داده شده است. ترکیب هیدروچار+ پرلیت نیز اگرچه با هیدروچار اختلاف معنی‌داری ندارد، با این حال حضور پرلیت تا حدودی توانسته شرایط را برای افزایش زنده‌مانی باکتری بهبود بخشد. بیوچار نیز دارای اختلاف معنی‌دار با باگاس و پیت بود و با گذشت ۳٦٥ روز شاهد کاهش جمعیت در این ماده بودیم (شکل۲). در اکثر تحقیقات به اثرات مثبت بیوچار در زنده‌مانی باکتری اشاره می‌شود و دلیل این اثرات مثبت را به مشخصات بارز و مطلوب بیوچار از جمله pH، جذب‌کننده مواد سمی، ارائه دهنده کربن اضافی و غیره نسبت می‌دهند (کاستالدی و همکاران، ۲۰۱۱). با این حال، کاهش جمعیت میکروبی پس از کاربرد بیوچار نیز مشاهده شده است که به دلیل دسترسی کم کربن و نیتروژن بوده است (آمونت، ۲۰۰۹). در این آزمایش بیوچار نسبت به حامل‌های دیگر از C/N بالایی برخوردار بود (جدول ۳). هرچند نسبت C/N یکی از معیارهای ارزیابی وضعیت پوسیدگی و میزان تجزیه بقایای گیاهی می‌باشد. بالا بودن نسبت C/N، شرایط را برای استقرار باکتریها بر روی این ماده و استفاده از آن به عنوان منبع کربن دشوار می‌سازد. از سوی دیگر، درجه حرارت بالای پیرولیز باعث کاهش CEC می‌شود (اسمرنیک، ۲۰۰۹). چسبندگی باکتریایی به بیوچار نیز به اندازه منافذ بستگی دارد (ریورا، ۲۰۰۱). اندازه منافذ برای چسبندگی مطلوب باید ٥-۲ میکرومتر باشد. (سامونین و الیکووا، ۲۰۰٤). بنابراین احتمال دارد که توانایی بیوچارها برای حفظ باکتری‌ها به شدت متفاوت باشد. پس خواص بیوچار با توجه به مواد اولیه، از جمله محتوای خاکستر، اندازه منافذ و عناصر غذایی بسیار متغیر می‌باشد. با این حال، مواد مغذی موجود در بیوچار می‌تواند طی مدت زمان طولانی (حدود یک سال) دچار کمبود شود که در نتیجه

www.SID.ir

Archive of SID

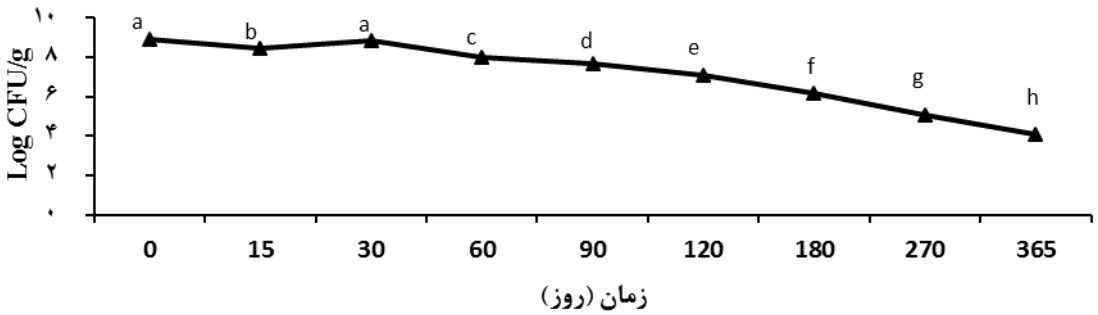
تنفس پایه پایین آمده و فعالیت میکروبی کاهش یابد (بعث و همکاران، ۲۰۰۳). اگامبردیوا و همکاران (۲۰۱۷) زنده‌مانی باکتری *برادی‌ریزوبیوم ژاپونیکوم* را پس از شش هفته با استفاده از بیوچار و هیدروچار به عنوان حامل، در شرایط تنش خشکی ارزیابی کردند. آن‌ها بیان کردند که زنده‌مانی این باکتری در هیدروچار نسبت به بیوچارهایی که از پوست ذرت و چوب به دست آمده، بیشتر بود. مطابق جدول ۳ علت کاهش معنی‌دار تعداد باکتری در پرلیت را می‌توان به دلیل کمبود عناصر غذایی به ویژه نبود کربن آلی بیان کرد و این سبب می‌شود که پرلیت به تنهایی حامل مناسبی محسوب نشود (بشارتی و همکاران، ۲۰۰٤). خاکاره نیز C/N بالایی داشت (جدول ۳)، بنابراین به دلیل غالب بودن ترکیبات لیگنینی که به تجزیه مقاوم می‌باشند و نبود کربن قابل دسترس، شاهد کاهش جمعیت در این ماده بودیم. در نتیجه خاکاره میل و رغبتی را برای حضور میکروارگانیسم‌ها و موجودات تجزیه‌کننده برنمی‌انگیزد. با این حال، با افزودن موادی که دارای عناصر غذایی باشند می‌توان سبب جلب میکرواگانیسم‌ها شده و در نهایت موجب تجزیه خاکاره شد (ملکوتی، ۱۹۹٤). به طوریکه مطابق شکل ۲ خاکاره در ترکیب با پرلیت در مقایسه با پرلیت و خاک اره به صورت تنها، توانسته زنده‌مانی باکتری را تا حدودی افزایش دهد. شریعتی و علیخانی (۲۰۱٤) در کاربرد زادمایه‌های باکتری *سودوموناس فلورسنس* برای بررسی برخی شاخص‌های رشد و جذب عناصر غذایی توسط گیاه ذرت، نشان دادند که استفاده از ورمی‌کمپوست و مخلوط پرلیت+ بنتونیت+ ورمی‌کمپوست به عنوان بهترین حامل در تهیه و کاربرد زادمایه این باکتری می‌باشد. منیرالزمان و همکاران (۱۹۹۲) بکارگیری پنج نوع ماده حامل (فیلتر ماد، پیت، زغال چوب، باگاس نیشکر و خاک اره) را که در بنگلادش به مقدار فراوان یافت می‌شوند، در نگهداری *ریزوبیوم* مطالعه و پایداری دو سویه ریزوبیومی را در انکوباتور بر روی حامل‌های مذکور به مدت ۹۰ روز بررسی کردند. در این تحقیق فیلتر ماد، پیت و زغال چوب بهترین مواد حامل بودند و تعداد سلول زنده 10^{8}CFU/g به مدت ۷۵ روز شمارش شد. در آزمایش حاضر، دلیل برتری تیمارهای ترکیبی (خاکاره+ پرلیت، باگاس+ پرلیت، هیدروچار+ پرلیت و بیوچار+ پرلیت در مقایسه با خاکاره، پرلیت، هیدروچار و بیوچار) را نیز می‌توان اینگونه توجیه کرد که در مجموع ظرفیت بالای نگهداری آب، وجود ماده آلی در کنار چسبندگی تیمارها، ایجاد یک فرمولاسیون مناسب و مطلوب برای باکتری می‌نماید (شکل ۲). محققان مختلفی برتری تیمارهای ترکیبی را گزارش کردند (سکار و کامرگام، ۲۰۱۰؛ گندهی و سیواکومار، ۲۰۱۰). باکتری‌ها به فاز توقف و مرگ، رقابت بین باکتری‌ها و غیره باعث کاهش جمعیت باکتری می‌گردد. اما نکته مهم در معرفی حامل‌های میکروبی، ارائه فرمولاسیونی است که در بازه زمانی طولانی‌تری بتواند جمعیت فعال و زنده میکروبی را حفظ نماید و قادر باشد استانداردهای لازم در زمینه تولید و عرضه کودهای زیستی را تأمین نماید یا فراتر از آن باشد.

اثر زمان بر تعداد باکتری

اثر اصلی زمان بر تعداد باکتری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). شکل ٤ نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد باکتری با زمان، صرف نظر از نوع حامل دارای یک رابطه کاهشی می‌باشد. شاید بتوان گفت که با گذشت زمان عوامل مختلفی از قبیل کمبود عناصر غذایی، تجمع متابولیت‌های بازدارنده، ورود

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۴- اثر زمان بر میانگین لگاریتم تعداد باکتری

تست جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم در پایان ماه چهارم

کشت در پلیت

نتایج تست جوانه‌زنی در پلیت با بکارگیری زادمایه‌ها که چهار ماه از تولید آنها گذشته بود نشان داد که این زادمایه‌ها می‌توانند اثرات مثبتی بر جوانه‌زنی بذر گندم داشته باشند ولی با این حال اختلاف معنی‌داری با شاهد از نظر درصد جوانه‌زنی نداشتند و به طور ۱۰۰ درصد، ده بذر موجود در هر زادمایه به طور همزمان شروع به جوانه‌زنی نمودند. صحت این موضوع از آن جهت است که مواد مورد استفاده در زادمایه‌های میکروبی اثر بازدارنده بر جوانه‌زنی و رشد بذرها نداشته و حتی گاهاً باعث ترغیب رشد و بهبود جوانه‌زنی یا رشد آن شده‌اند (جدول ٤).

جدول ۴- درصد جوانه‌زنی در کشت پلیت

زادمایه‌ها	تعداد بذور رشد یافته	درصد
باگاس	۱۰	٪۱۰۰
پرلیت	۱۰	٪۱۰۰
پیت	۱۰	٪۱۰۰
هیدروچار	۱۰	٪۱۰۰
بیوچار	۱۰	٪۱۰۰
خاک‌اره	۱۰	٪۱۰۰
باگاس+ پرلیت	۱۰	٪۱۰۰
هیدروچار+ پرلیت	۱۰	٪۱۰۰
بیوچار+ پرلیت	۱۰	٪۱۰۰
خاک‌اره+ پرلیت	۱۰	٪۱۰۰
شاهد	۱۰	٪۱۰۰
Enterobacter	۱۰	٪۱۰۰

تحلیل همبستگی برای خصوصیات اندازه‌گیری شده در کشت درون پلیت

در هر دو کشت نتایج آزمون ضرایب همبستگی برای متغیرهای ذکر شده حاکی از وجود رابطه معنی‌دار بین این متغیرها بود. در کشت درون پلیت مقادیر ضریب همبستگی بین وزن تر ساقه با وزن خشک ساقه، طول ساقه، وزن تر کل و وزن خشک کل به ترتیب ۰/۸۸٦، ۰/٦۷۹، ۰/۹۷۸ و ۰/۸۹۳ به دست آمد

www.SID.ir

Archive of SID

که این مقادیر به ترتیب در سطح احتمال یک، پنج، یک و یک معنی‌دار شدند. مقادیر ضریب همبستگی بین وزن خشک ساقه با طول ساقه، وزن تر کل و وزن خشک کل به ترتیب ۰/۸۹۲، ۰/۹۹۷ و ۰/۸۵٦ به دست آمد که این مقادیر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. همچنین ضریب همبستگی بین وزن تر کل و وزن خشک کل با طول ساقه و وزن تر کل با وزن خشک کل به ترتیب ۰/٦٦۷، ۰/۸۹٤ و ۰/۸٦٤ به دست آمد که این مقادیر به ترتیب در سطح احتمال پنج، یک و یک معنی‌دار شدند. اما برخلاف انتظار بین جمعیت زنده باکتری‌ها در حامل‌ها و صفات مورد اندازه‌گیری، همبستگی معنی‌دار به دست نیامد. دلیل آن را شاید بتوان کوتاهی مدت کشت گیاه بیان کرد، به طوریکه باکتری در این مدت کوتاه نتوانسته اثرگذار باشد. بنابراین می‌توان گفت که رشد جوانه‌های گندم می‌تواند متأثر از مواد حامل باشد. تیمارهای پیت، هیدروچار، باگاس+ پرلیت و سوسپانسیون باکتری توانستند نسبت به سایر حامل‌ها بیشترین اثر را بر خصوصیات اندازه‌گیری شده داشته باشند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از شمارش باکتری‌ها نشان داد که از میان حامل‌ها به ترتیب حامل‌های باگاس، باگاس+ پرلیت و پیت توانستند بالاترین زنده‌مانی باکتری را در مدت ۳٦۵ روز (CFU/g ۱۰٦<) داشته باشند. از طرف دیگر میان حامل‌های مورد استفاده، در حامل خاکاره بعد از گذشت ٦ ماه، هیچ جمعیت زنده باکتری شمارش نشد. بالاترین جمعیت شمارش شده (CFU/g ۱۰۹) بعد از گذشت یک سال از میان حامل‌های مورد استفاده در باگاس به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از تست جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گندم در پایان ماه چهارم نشان داد که مواد مورد استفاده در حامل‌های میکروبی اثر بازدارنده بر جوانه‌زنی بذرها نداشته و حتی در مواردی باعث ترغیب رشد و بهبود جوانه‌زنی و رشد آن‌ها شد. از میان زادمایه‌ها، هیدروچار و باگاس+ پرلیت در کشت پلیت نتایج تکرارپذیری داشتند و در هر دو حالت در اغلب ویژگی‌های اندازه‌گیری شده، میانگین‌های بالاتری را به خود اختصاص داده بودند، هر چند بیشترین جمعیت باکتری در باگاس شمارش شده بود. مقایسه این زادمایه‌ها با تیمارهای شاهد (بدون باکتری و حامل) و سوسپانسیون باکتری (مایه تلقیح بدون حامل) نشان داد که این زادمایه‌ها در تمام خصوصیات اندازه‌گیری شده، توانسته‌اند اثرگذار باشند. مقایسه تیمار شاهد با سوسپانسیون باکتری نیز نشان داد که سوسپانسیون باکتری نسبت به شاهد اثرگذاری بهتری داشته است. در پایان با توجه به یافته‌های این آزمایش و راحتی و در دسترس بودن حامل‌های مورد استفاده، حامل باگاس+ پرلیت در افزایش زنده‌مانی باکتری بهترین نتیجه را به همراه داشت. لازم به ذکر است که این تحقیق فقط توانایی چند ماده حامل را مقایسه کرده است و جهت تکمیل و کاربردی نمودن نتایج حاصل از این آزمایش، پیشنهاد می‌شود برای بررسی اثرات این حامل‌ها بر رشد گیاهان، آزمایشاتی در سطح گلخانه و مزرعه انجام گیرد.

منابع مورد استفاده

Abit SM, Bolster CH, Cai P and Walker SL. 2012. Influence of feedstock and pyrolysis temperature of biochar amendments on transport of *Escherichia coli* in saturated and unsaturated soil. Environmental Science and Technology, 46(15): 8097-8105.

Amonette JE and Joseph S. 2012. Characteristics of biochar: microchemical properties. In biochar for environmental management: Science and Technology, 65-84.

www.SID.ir

Archive of SID

Azimzadeh Y and Najafi N. 2016. Effects of biochar on soil physical, chemical and biological properties. Land Management Journal, 4(2): 161-173. (In Persian).

Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances, 16(4): 729-770.

Bais HP, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM and Vivanco JM. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. Science, 301(5638): 1377-1380.

Besharati H, Saleh Rastin N, Malakouti MJ and Alizadeh A. 2004. Study of *Thiobacilli* survival on different carriers. Journal of Soil and Water Sciences, 18(2): 168-178. (In Persian).

Chen B, Zhou D and Zhu L. 2008. Transitional adsorption and partition of nonpolar and polar aromatic contaminants by biochars of pine needles with different pyrolytic temperatures. Environmental Science and Technology, 42(14): 5137-5143.

Chun Y, Sheng G, Chiou CT and Xing B. 2004. Compositions and sorptive properties of crop residue-derived chars. Environmental Science and Technology, 38(17): 4649-4655.

Chao WL and Alexander M. 1984. Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. Applied and Environmental Microbiology, 47(1): 94-97.

Castaldi S, Riondino M, Baronti S, Esposito F, Marzaioli R, Rutigliano F and Miglietta F. 2011. Impact of biochar application to a Mediterranean wheat crop on soil microbial activity and greenhouse gas fluxes. Chemosphere, 85(9): 1464-1471.

Egamberdiyeva D, Juraeva D, Poberejskaya S, Myachina O, Teryuhova P, Seydalieva L and Aliev A. 2004. Improvement of wheat and cotton growth and nutrient uptake by phosphate solubilizing bacteria. In Proceeding of 26th Annual Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture. Auburn, Pp. 58-65.

Egamberdieva D, Reckling M and Wirth S. 2017. Biochar-based *Bradyrhizobium* inoculum improves growth of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) under drought stress. European Journal of Soil Biology, 78: 38-42.

Fages J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. Symbiosis-Rehovot, 12: 15-15.

Gandhi A and Sivakumar K. 2010. Impact of vermicompost carrier based bioinoculants on the growth, yield and quality of rice (*Oryza sativa* L.) CV NLR 145. The Ecoscan, 4(1): 83-88.

Huber D, El-Nasshar H, Moore L, Mathre D and Wagner J. 1989. Interaction between a peat carrier and bacterial seed treatments evaluated for biological control of the take-all diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.). Biology and Fertility of Soils, 8(2): 166-171.

Kazemi Oskuei BK, Bandehagh A, Sarikhani MR. and Komatsu S. 2017. Protein profiles underlying the effect of plant growth-promoting rhizobacteria on canola under osmotic stress. Journal of Plant Growth Regulation, 37(2): 560-574.

Khavarzi K and Rejali F. 2000. Use of inexpensive and local materials as carriers of *Bradyrhizobium Japonicum* bacteria. Journal of Soil and Waters Sciences, 14(1): 36-45. (In Persian).

Leach A and Mumford J. 2008. Pesticide environmental accounting: A method for assessing the external costs of individual pesticide applications. Environmental Pollution, 151(1): 139-147.

Muhammad N, Dai Z, Xiao K, Meng J, Brookes PC, Liu X and Xu J. 2014. Changes in microbial community structure due to biochars generated from different feedstocks and their relationships with soil chemical properties. Geoderma, 226: 270-278.

Moradi Sh and Sarikhani MR. 2016. Comparison of dissolution of phosphate from sources of phosphate rock and Tricalcium phosphate by some phosphate solubilizing bacteria. Second National Congress for the Development of agricultural science and Natural Resources, Gorgan. Iran, 1-6. (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Mashhadi Asghari S and Aliasgharzadeh N. 2005. Comparison of five carriers of *Sinorrhizobium meliloti* to produce alfalfa inoculant. Journal Water and Soil Sciences, 8(4): 63-75. (In Persian).

Malakooti MJ. 1994. Sustainable agriculture and increasing yield by optimizing fertilizer use in Iran. Tehran Agricultural Education Publication, 460. (In Persian).

Owlia P, Fatemi AZ, Salimi H, Rasooli I, Sadrnia M, and Armandzadegan M. 2013. Evaluation of appropriate carriers for bio-control agents of apple fire blight. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 23(1): 31.

Page AL, Miller RH and Keeney DR. 1982. Method of soil analysis. part 2- chemical and microbiological properties. 2nd ed., ASA pub. Buxton, Madison, WI, 159-166.

Rivera-Utrilla J, Bautista-Toledo I, Ferro-García MA. and Moreno-Castilla C. 2001. Activated carbon surface modifications by adsorption of bacteria and their effect on aqueous lead adsorption. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 76(12): 1209-1215.

Roughley R. 1976. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants, 7(1): 125.

Stephens J and Rask H. 2000. Inoculant production and formulation. Field Crops Research, 65(2): 249-258.

Smith R. 1992. Legume inoculant formulation and application. Canadian Journal of Microbiology, 38(6): 485-492.

Sarikhani MR. 2016. Practical methods for the quality control of inoculant biofertilizers. Morteza Dasht Publication, 58-63. (In Persian).

Salem M, Kohler J, Wurst S and Rillig MC. 2013. Earthworms can modify effects of hydrochar on growth of *Plantago lanceolata* and performance of arbuscular mycorrhizal fungi. Pedobiologia, 56(4): 219-224.

Samonin V and Elikova E. 2004. A study of the adsorption of bacterial cells on porous materials. Microbiology, 73(6): 696-701.

Sekar KR and Karmegam N. 2010. Earthworm casts as an alternate carrier material for biofertilizers: assessment of endurance and viability of *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum*. Scientia Horticulturae, 124(2): 286-289.

Shariati Sh and Alikhani A. 2014. The application of *Pseudomonas fluorescens* bacteria inoculants on certain growth indices and nutrient uptake in maize. Journal of Agricultural Knowledge and Sustainable Production, 24(4): 46-59. (In Persian).

Van Elsas JD and Heijnen C. 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. Biology and Fertility of Soils, 10(2): 127-133.

www.SID.ir