Archive of SID

نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۰ شماره ۱ صفحه‌های ۱ تا ۱۴ / سال ۱۳۹۹

غربالگری و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات متحمل گرما

بهمن خوشرو[۱]*، محمدرضا ساریخانی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۲۱

۱-دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
* مسئول مکاتبه، پست الکترونیکی: bahmankhoshru@yahoo.com

چکیده

باکتری‌های حل‌کننده فسفات متحمل به دماهای بالا، کاندید مناسبی برای استفاده در کودهای میکروبی فسفاته گرانوله می‌باشند. محصول تولیدی در فرآیند تهیه این کودها، ناگزیر به تحمل حرارت بالا (۵۰°C -۵۵) بوده و درصد رطوبت بسیار پایینی دارا می‌باشد. بر این اساس، در این تحقیق کارایی انحلال فسفات و تحمل گرمایی ۱۵۰ جدایه باکتری از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز مورد ارزیابی قرار گرفت. توانایی انحلال فسفات باکتری‌ها به روش نیمه‌کمی و کمی در محیط اسپربر جامد و مایع در حضور منبع کم‌محلول تری‌کلسیم فسفات تحت شرایط دمای عادی (۲۸ °C) و دمای ۵۵ درجه سلسیوس ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین باکتری‌ها از نظر انحلال فسفات وجود دارد. در دمای معمولی از ۱۵۰ باکتری، نزدیک به ۱۷ درصد باکتریها (۲۵ جدایه) توان انحلال فسفات کم‌محلول را داشتند و نسبت قطر هاله به کلنی (HD/CD) آنها بین ۲/۸ – ۱/۲ متغیر بود. در روش کمی نیز توان حل‌کنندگی ۲۵ جدایه در محدوده ۲۹۲/۸۹- ۱۷۵/۸ میلی‌گرم فسفر بر لیتر قرار داشت. از بین ۲۵ جدایه نیز تنها ۷ باکتری قادر به زنده‌مانی در دمای ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱۶ساعت بودند، که از میان آنها جدایه‌های C1-4O، C19-4O و C8-12M به‌ترتیب با مقادیر ۲/۵، ۲/٤ و ۲/۲ بالاترین نسبت قطر هاله به کلنی را داشتند. میزان آزادسازی فسفر در محیط مایع توسط این باکتری‌ها به‌ترتیب ۲٤٤/۰۸، ۲۵٦/٤٤ و ۲۱٦/۱٤ میلی‌گرم بر لیتر بود. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که این باکتریها متعلق به جنس‌های *Enterobacter* و *Stenotrophomonas* می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده فسفات، تحمل گرمایی، زنده‌مانی، کود میکروبی فسفاته

www.SID.ir

Archive of SID

Screening and Identification of Heat Resistant Phosphate Solubilizing Bacteria

B khoshru[1*], MR Sarikhani[2]

Received: December 10, 2017 Accepted: April 17, 2019
[1]PhD 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
*Corresponding Author Email: bahmankhoshru@yahoo.com

Abstract

Bacteria with high phosphate solubility and resistance to high temperature are suitable candidates for use in granular phosphatic microbial fertilizers (PMF). The prepared product in processing of these fertilizers (PMF) is exposed to high temperatures (50-55 ° C) under very low moisture conditions. Accordingly, in this research, the efficiency of phosphate dissolution and temperature tolerance of 150 bacterial isolates were evaluated. These bacteria were prepared in the soil biology laboratory of University of Tabriz. The phosphate solubility of these bacteria was evaluated by semi-quantitative and quantitative methods in solid and liquid Sperber medium in the presence of low-soluble tricalcium phosphate (TCP) source at the temperatures of 28 °C and 55 °C. The results showed that there was a significant difference between bacteria in terms of dissolution of phosphate. At a typical temperature among 150 bacteria, 25 bacteria (17%) had no phosphorus dissolution capacity, and the HD/CD ratio for these 25 bacteria was 1.2 to 2.8. In the quantitative method, the solubility potential of 25 isolates was 175.88- 292.98 mg P/l. Among the 25 isolates, only 7 bacteria were able to survive at 55 ° C for 16 hours, witch between them the C1-4O, C19-4O and C8-12M bacteria had the highest halo diameters with values of 2.5, 2.4 and 2.2 for the HD/CD ratio, respectively. The amounts of phosphorus release by these bacteria in the liquid medium were 244.08, 256.44 and 216.14 mg/l, respectively. The molecular identification of these bacteria showed that they were belonged to the genus *Enterobacter* and *Stenotrophomonas*.

Keywords: Phosphatic microbial fertilizer, Phosphate solubilizing bacteria, Thermal tolerance, Viability

مقدمه

فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف اصلی برای رشد و نمو گیاهان است. گرچه فسفر به مقدار فراوانی در خاک‌ها یافت می‌شود اما در مقایسه با سایر عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، تحرک و قابلیت جذب آن در خاکها کم می‌باشد (خان و همکاران ۲۰۰۷). نزدیک به ۸۰ درصد فسفر اضافه شده به خاک ممکن است بر اثر تثبیت به صورت آلی و معدنی و یا حتی فیزیکی برای گیاهان غیرقابل استفاده گردد (راگوتاما و کارتیکان ۲۰۰۵، خوشرو و ساریخانی ۲۰۱۹). عمدتاً برای جبران کمبود فسفر، از کودهای فسفری استفاده می‌شود. کاربرد متوالی این کودها منجر به کاهش حاصلخیزی خاک، کاهش تنوع و فعالیت‌های میکروبی و کاهش عملکرد گیاهان زراعی می‌شود (کارپاگام و ناقلکشی ۲۰۱٤، خوشرو و همکاران ۲۰۱۹b). ضرورت یافتن جایگزینی مناسب برای انحلال و رهاسازی

www.SID.ir

Archive of SID

فسفات‌های تجمع یافته در خاک زمانی بیش‌تر احساس می‌شود که بدانیم منابع فسفاته موجود در خاک قابلیت تامین فسفات مورد نیاز گیاهان برای تولید بهینه آنها را تا ۱۰۰ سال دارا می‌باشد (گلدستین و همکاران ۱۹۹٤) و کافی است که این منبع عظیم فسفر را به صورتی برای گیاه قابل جذب و استفاده نمود. 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 (خوشرو و ساریخانی ۲۰۱۹، خوشرو و همکاران ۲۰۱۸، علی اصغرزاد ۱۹۹۸، حیدریان و ساریخانی ۲۰۱۲، شکیلا و همکاران ۲۰۱۷). با توجه به اهمیت فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای محصولات کشاورزی، استفاده از کود میکروبی فسفاته مورد توجه است (ضیائیان و همکاران ۲۰۱۰، خوشرو و همکاران ۲۰۱۹a). در این نوع کود از سنگ فسفات به عنوان منبع تامین‌کننده فسفر استفاده می‌شود اما با توجه به پایین بودن میزان انحلال آن، فسفر موجود بایستی از طریق راهکارهای زیستی به فرم محلول درآید. بهره‌گیری از باکتری‌های حل‌کننده فسفات به فرایند انحلال و فراهمی فسفات برای گیاه کمک خواهد نمود و 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 (حیدریان و ساریخانی ۲۰۱۲، ملبوبی و همکاران ۲۰۰۹، خوش‌منظر و همکاران ۲۰۱۹).

با افزایش روزافزون جمعیت دنیا، نیاز به افزایش تولیدات غذایی ضرورت دارد. این افزایش تولید به نوبه خود تولید بیشتر کودها را می‌طلبد (رضایی فر ۲۰۰۸). اما مشکلاتی در زمینه استفاده از کودها در مزارع وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: حمل و نقل به علت حجم زیاد، رطوبت، توزیع کود در مزرعه، گرد و غبار و انبارداری. راه‌حلی که برای رفع این مشکلات در نظر گرفته می‌شود، استفاده از فشرده‌سازی مواد پودری همانند پلت و گرانول کردن می‌باشد (قاسمی و همکاران ۲۰۱۳).

گرانول کردن یکی از مهم‌ترین روش‌ها در صنعت کودسازی است. تا قبل از سال ۱۹۵۰ اکثر کودهای شیمیایی به شکل غیر گرانوله به بازار عرضه می‌شدند. در این حالت وقتی مواد انبار می‌شدند ضمن کلوخه‌ای شدن می‌توانند مستعد تولید گرد و غبار نیز باشند (هیکس و همکاران ۱۹۹۷). گرانول شدن یک اصطلاح عمومی برای اندازه بزرگ شده از یک ذره به شکل کره با قطر مطلوب است. مزایای گرانول کردن عبارت هستند از: بهبود مشکل جریان‌پذیری، اختلاط بهتر ماده اولیه با سایر مواد مورد نظر که از مواد مختلف تشکیل شده، کاهش گرد و خاک، رسیدن به یک شکل و اندازه مورد نظر از ذرات، آزادسازی کنترل شده مواد مغذی مورد نیاز گیاه و همچنین امکان توزیع کودهای گرانولی توسط دستگاه‌های کودپاش و بذرکارها (ردی و همکاران ۱۹۹۷). گرانولاتور دوار یکی از متداول‌ترین ابزارهای گرانول کردن در صنعت گرانول‌سازی است که در آن ذرات تحت حرکت دورانی استوانه دوار، در بستر مرطوب با هم برخورد کرده و رشد می‌کنند (شرینگتون و همکاران ۱۹۸۱).جهت گرانول کردن کودهای پودری ارگانیک دو روش تر و خشک وجود دارد. در روش خشک از فشار و حرارت برای ذوب شدن مواد در همدیگر استفاده می‌شود. گرانولاسیون مرطوب شامل

www.SID.ir

Archive of SID

مرطوب نمودن مخلوطی از پودرهای خشک اولیه توسط مایع گرانولاسیون می‌باشد (پوزین ۱۹۸٦). کودهای میکروبی فسفاته بیشتر به صورت گرانوله مورد استفاده قرار می‌گیرند و استفاده از تیمار گرمایی نسبتاً بالا یکی از فرایندهای تهیه آن‌ها به شمار می‌رود. همانطور که در بالا ذکر شد فرآیند تولید کودهای گرانوله در صنعت مستلزم خشک‌کردن آن در درجه حرارت (٤٠-٥٠ درجه سلسیوس) می‌باشد (قنبری ۲۰۰۸). لذا استفاده از باکتری‌هایی که متحمل به حرارت بوده برای تهیه کودهای میکروبی حائز اهمیت است. گرچه تاکنون آزمایش‌های زیادی در مورد باکتری‌های حل‌کننده فسفات در سرتاسر جهان انجام گرفته است (چابوت و همکاران ۱۹۹٦، افضل و همکاران ۲۰۰۵، ساریخانی و همکاران ۲۰۱٦) ولی بررسی توان تحمل گرمایی این دسته از میکروارگانیسم‌ها کمتر انجام شده و نیاز به انجام آزمایش‌های بیشتری دارد. در حال حاضر این نوع از باکتری‌ها کمتر در دسترس می‌باشند و تحقیقات اندکی در این زمینه صورت گرفته است، بنابراین در این تحقیق به جنبه تحمل دمای بالا روی باکتری‌های حل‌کننده فسفات پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

باکتریها

در این پژوهش ۱۵۰ جدایه باکتری از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی توانایی انحلال فسفات کم‌محلول، ابتدا کشت باکتری‌ها در محیط عمومی NB[1] تهیه شده و پس از قرائت OD[2] (600nm) و یکسان‌سازی جمعیت باکتری، از مایه تلقیح اولیه برای کشت نقطه‌ای در محیط جامد Sperber (اسپربر ۱۹۵۸) استفاده شد.

اعمال تیمار گرمایی

به منظور بررسی اثر تیمار گرما در انحلال فسفر و زنده‌مانی باکتریها، پس از کشت باکتری‌ها در محیط Sperber جامد و مایع، برای بررسی انحلال فسفات کم‌محلول و تشکیل هاله توسط جدایه‌ها به دو صورت اقدام شد: الف- انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ب- انکوباسیون در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱٦ ساعت.

آزمون نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول

برای انجام این آزمون از محیط کشت اسپربر استفاده شد که در این محیط از منبع فسفر کم‌محلول تری‌کلسیم فسفات به عنوان تنها منبع فسفر استفاده شد. برای هر سه باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته و سطح هر پتری به ٦ قسمت مساوی تقسیم شد، مرکز هر قسمت با ٥ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح - گردید، ظروف پتری تلقیح شده در دو دمای متفاوت ۲۸ و ۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پلیت‌های داخل آون بعد از تیمار دمایی ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱٦ ساعت، دوباره به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس انتقال یافتند. تمامی پلیت‌ها در سه نوبت ۳، ٥، ۸ و ۱۲ روز پس از تلقیح، از انکوباتور خارج شده و قطر کلنی رشد یافته (CD[3]) و نیز قطر هاله شفاف

[1] Nutrient Broth

[2] Optical Density

[3] Colony diameter

www.SID.ir

Archive of SID

حاصل از انحلال فسفات (HD[1]) به دقت اندازه‌گیری شد، متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) در روز دوازدهم برای هر جدایه محاسبه گردید. تخمین نیمه‌کمی توانایی انحلال فسفات توسط میکروارگانیسم‌ها به روش غربالگری در تشتک پتری انجام گردید که هاله شفاف اطراف کلنی باکتری در محیط حاوی فسفات معدنی، نمایانگر این توانایی است (سان و همکاران ۲۰۰۶).

آزمون کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول

در این مرحله برای بررسی دقیق‌تر میزان حل‌کنندگی فسفات هر باکتری با سه تکرار در محیط کشت اسپربر مایع کشت شد. ارلن‌های حاوی محیط مایع تلقیح شده و نمونه شاهد در دو دمای متفاوت ۲۸ و ۵۵ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور در تاریکی و شیک ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. ارلن‌های داخل آون بعد از تیمار گرمایی ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱۶ ساعت، دوباره به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس انتقال یافتند و همه ارلن‌ها به مدت ۱۴۴ ساعت شیک شدند. در این مرحله سلول‌های باکتری، ذرات معلق و فسفات کم‌محلول به کمک سانتریفوژ (در دور ۵۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه) از سوسپانسیون جمع‌آوری و مقدار فسفر محلول در مایع صاف رویی به روش وانادات-مولیبدات اندازه‌گیری شد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶).

شناسایی باکتریهای متحمل گرما

برخی از ویژگی‌های شکل‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌ها به کمک رنگ‌آمیزی گِرم و تست‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند (خوشرو و همکاران b ۲۰۱۵). برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها از توالی‌یابی ژن 16S rRNA به کمک آغازگرهای عمومی 27F و 1492R (خریداری شده از شرکت ژن فناوران) انجام شد (جدول ۱). برنامه PCR به کار رفته دارای ۳۰ چرخه بود که در دستگاه ترموسایکلر Flexigene صورت گرفت. این چرخه‌ها شامل، یک چرخه نخستین با دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ٤ دقیقه، در ادامه دمای ۹٤ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، دمای ۵۳ درجه سلسیوس (دمای پیوند آغازگر) برای ۱ دقیقه و دمای فراوان شدن در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه بود که در پایان یک چرخه اضافی دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه نیز انجام شد. یادآور می‌شود که برای انجام PCR از تک کلنی باکتری‌ها بهره‌گیری شد و بدین گونه از استخراج DNA ژنومی باکتری چشم‌پوشی 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. پس از ران شدن محصول PCR بر روی ژل آگاروز و اطمینان از تکثیر باند مورد نظر و مشاهده نوارهای پدیدارشده (نزدیک ۱۵۰۰ جفت باز)، بقیه DNA تکثیر شده از قطعه رمزکننده 16S rRNA جهت توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفت (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸). پس از توالی‌یابی نمونه‌ها، توالی‌های مورد نظر در پایگاه

[1] -Halo diameter

www.SID.ir

Archive of SID

اطلاعاتی NCBI[1] ، BLAST-n[2] شدند و به بررسی یافته‌های آن‌ها پرداخته شد.

جدول ۱- آغازگرهای عمومی برای تکثیر بخش 16S rDNA باکتری‌ها.

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای پیوند
27F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	T_m:53
1492R	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'	

آنالیز داده‌ها

این آزمایش با طرح کاملاً تصادفی با اعمال دو تکرار برای هر تیمار (باکتری) اجرا شد. آنالیز واریانس با نرم افزار SPSS، رسم نمودارها با نرم افزار Excel و مقایسات میانگین نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

از ۱۵۰ باکتری بانک میکروبی مورد ارزیابی، تنها ۲۵ باکتری (حدود ۱۷٪) قادر به انحلال فسفات کم‌محلول و تشکیل هاله در محیط اسپربر جامد در دمای انکوباتور بودند. که از بین ۲۵ باکتری نیز تنها ۷ باکتری (نزدیک به ۵٪) در شرایط دمای ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱۶ ساعت زنده مانده و هاله تشکیل دادند.

آزمون نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول در دمای ۲۸ درجه سلسیوس

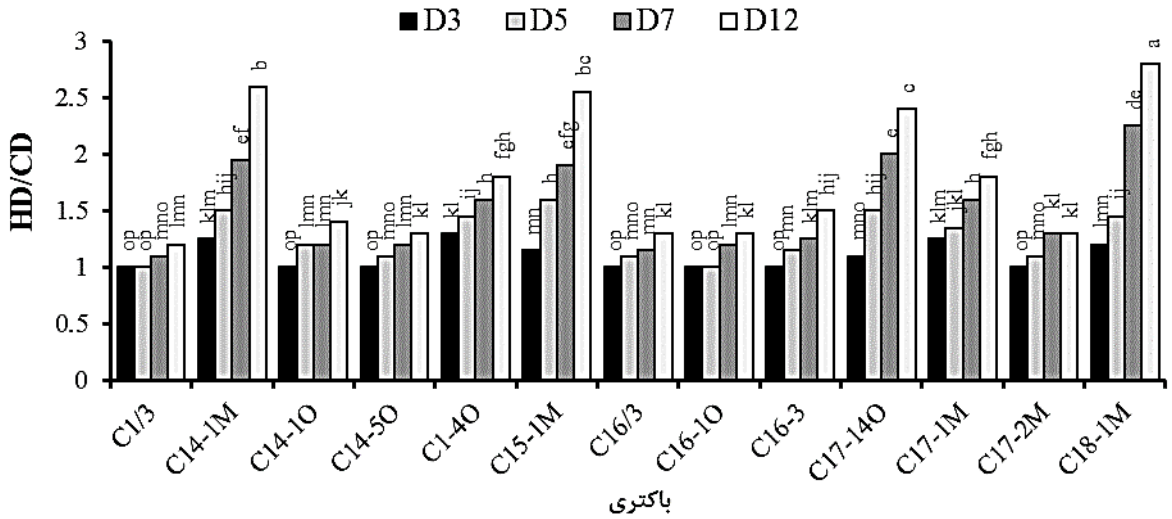
مشاهده هاله شفاف در محیط کشت جامد حاوی فسفر معدنی کم‌محلول یکی از روش‌های ارزیابی انحلال فسفات باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد (شکل ۱). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین باکتریها از لحاظ قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی کم‌محلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) مشخص کرد که باکتریهای C18-1M، C14-1M، C15-1M، C17-4O، C19-5O و C6-2M به ترتیب با دارا بودن مقادیر ۲/۸، ۲/٦، ۲/٥، ۲/٤، ۲/۳۵ و ۲/۳ بعد از گذشت ۱۲روز قدرت بالایی از نظر انحلال فسفات معدنی کم‌محلول داشتند. محدوده نسبت HD/CD برای این ۲۵ باکتری بین ۲/۸- ۱/۲ بود (شکل ۲).

[1] National center for biotechnological information
[2] Basic local alignment search tool (for Nucleotide)

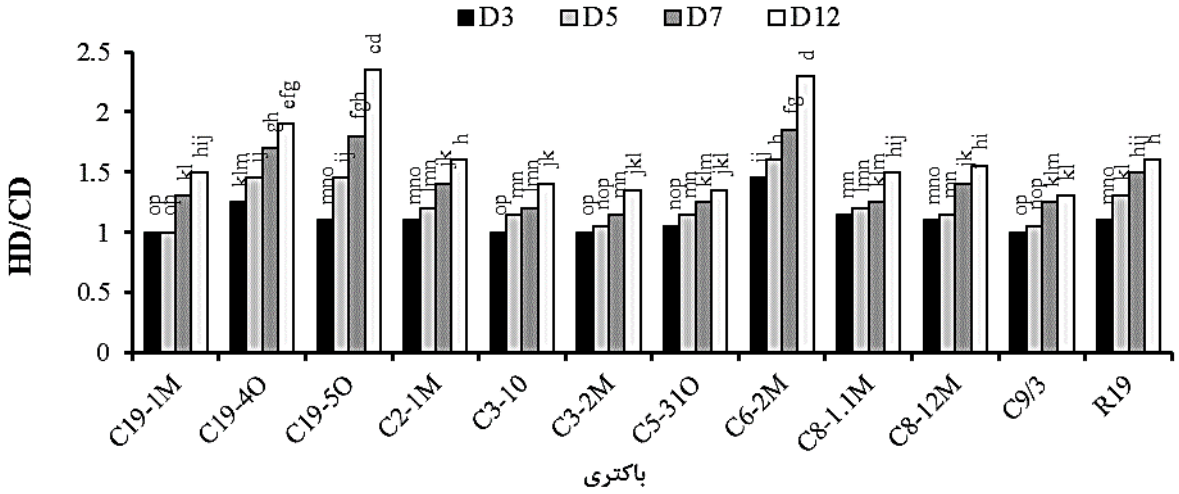
www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱: تشکیل هاله شفاف توسط باکتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس.



شکل ۲: توان حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش نیمه‌کمی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات.



ادامه شکل ۲: توان حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش نیمه‌کمی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات.

توجه به قطر هاله شفاف در مورد باکتری‌های حل‌کننده فسفات در گزینش این باکتریها در اغلب منابع آورده شده است به صورتی‌که در شیوه‌نامه ثبت مواد کودی موسسه تحقیقات خاک و آب (بی‌نام ۲۰۱۵)، در بررسی کیفیت حل‌کننده‌های فسفات کم‌محلول در محیط اسپربر، حداقل نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی،

www.SID.ir

Archive of SID

معادل ۱/۵ ذکر شده است و با توجه به آن ۱۲ جدایه از ۲۵ جدایه باکتری مورد ارزیابی دارای نسبت بالاتر از ۱/۵ بودند. خوشرو و همکاران (۱۳۹٤) گزارش کردند که از ۱۳ باکتری ایزوله شده از کودهای زیستی، ۸ جدایه قادر به تشکیل هاله شفاف در محیط اسپربر جامد بودند و محدوده نسبت HD/CD برای این ۸ باکتری بین ۳/۲ – ۱/۱ بود. علیخانی و همکاران (۲۰۰٦) با مطالعه ٤٤٦ باکتری جدا شده از خاک‌های ایران گزارش کردند که در خاک‌های کشور باکتری‌های با پتانسیل زیاد وجود دارند که قابلیت حل‌کردن فسفر از منابع آلی و معدنی را دارا هستند و توانایی آنها در حل کردن فسفر و تأمین نیاز فسفر گیاهان زراعی باید بررسی گردد. در میان جنس‌های باکتری‌که توان انحلال فسفات آنها اثبات شده است، می‌توان جنس‌های *Flavobacterium*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Agrobacterium*، *Enterobacter* و همچنین جنس‌های مختلف *Rhizobium* را نام برد (تیومرونگ و همکاران ۲۰۱۰). ایجاد هاله اطراف کلنی باکتری در محیط کشت حاوی فسفات کم‌محلول معدنی (عمدتاً تری‌کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت) به‌عنوان تنها منبع فسفر، بیانگر توانایی ریزجانداران در انحلال ترکیبات معدنی فسفر می‌باشد (اوستوال و همکاران ۱۹۷۲).

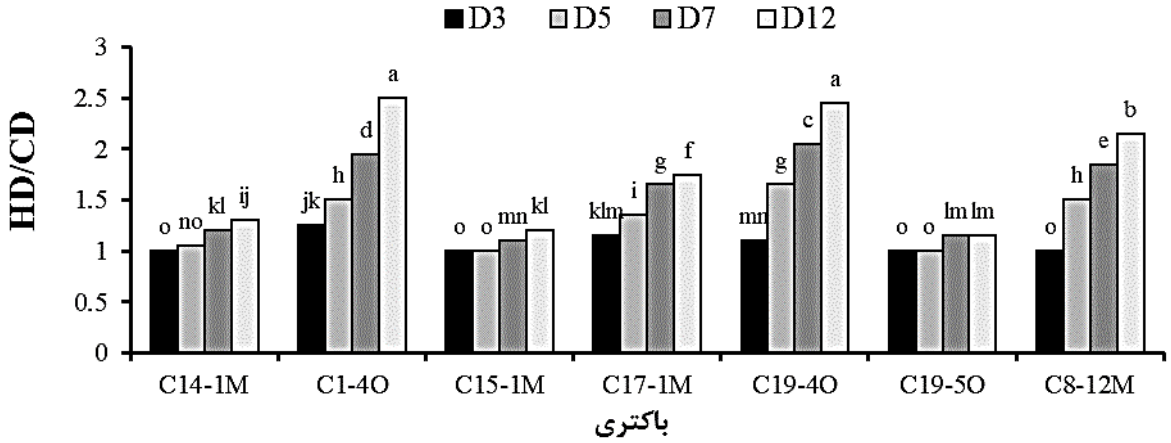
آزمون نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول در دمای ۵۵ درجه سلسیوس

از بین ۲۵ جدایه با توان ایجاد هاله شفاف در محیط اسپربر جامد، ۷ جدایه قادر به زنده‌مانی و تولید هاله تحت تیمار دمایی ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱٦ ساعت بودند (شکل ۳). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که از نظر قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول بین باکتریها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی کم‌محلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) مشخص کرد که جدایه‌های C1-4O، C19-4O و C8-12M به ترتیب با دارا بودن نسبت ۲/۵، ۲/٤۵ و ۲/۱۵ بعد از گذشت ۱۲روز قدرت بالایی از نظر انحلال فسفات معدنی کم‌محلول داشتند. محدوده نسبت HD/CD برای این ۷ باکتری بین ۲/۱ – ۱/۱۵ بود (شکل ٤). بایستی ذکر شود که باکتریهای C18-1M و C6-2M با وجود داشتن هاله قوی در شرایط دمای ۲۸ درجه‌سلسیوس (به‌ترتیب ۲/۸ و ۲/۳ میلی‌متر)، قادر به زنده‌مانی در دمای ۵۵ درجه نبودند. همچنین به‌نظر می‌رسد که توان ایجاد هاله توسط باکتری‌های C14-1M، C15-1M و C19-5O به شدت تحت تاثیر گرما قرار گرفته است. چراکه نسبت HD/CD برای این سه باکتری در حالت معمولی (۲۸ درجه سلسیوس) بترتیب ۲/٦، ۲/۵۵ و ۲/۳۵ بوده که این نسبت در حالت تیمار دمایی ۵۵ درجه به ترتیب به ۱/۳، ۱/۲ و ۱/۱۵ کاهش پیدا می‌کند و لذا اثر منفی دمای بالا بر این باکتری‌ها مشخص می‌گردد لذا این باکتری‌ها در گروه حل‌کننده‌های حساس به گرما قرار می‌گیرند.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۳: تشکیل هاله شفاف توسط باکتری‌ها در دمای ۵۵ درجه سلسیوس.



شکل ۴: توان حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش نیمه‌کمی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات تحت تیمار دمای ۵۵ درجه سلسیوس.

خوشرو و همکاران (۱۳۹۶) گزارش کردند که از ۹ باکتری جدا شده از خاکهای بومی که بر روی محیط جامد اسپربر قادر به رشد بودند تنها ۵ باکتری قادر به تشکیل هاله شفاف (جدایه‌های RPS4، RPS6، RPS7، RPS8 و RPS9) بودند و از بین این ۵ جدایه نیز بعد از کشت به روش نقطه‌گذاری در محیط اسپربر جامد و اعمال تیمار گرمایی، تنها دو باکتری RPS9 و RPS7 قادر به رشد و زنده‌مانی تحت دمای ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱۶ ساعت بودند. نسبت قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) این دو ایزوله (RPS9 و RPS7) در محیط اسپربر تری‌کلسیم‌فسفات به ترتیب ۲/۶۰ و ۲/۲۷ بود. خوشرو و همکاران (۱۳۹۶) در یک آزمایش به بررسی انحلال فسفات و تحمل گرمایی هفت باکتری به نام‌های *Pantoea agglomerans* P5، *P. fluorescens* Tabriz، *P. putida* Tabriz، *Pseudomnas* sp. C16-2O، *Enterobacter* sp. S16-3، *B. megaterium* JK6 و *B. firmus* پرداختند. نتایج نشان داد که باکتری *P. agglomerans*، *Pseudomonas* sp. C16-2O و *P. putida* Tabriz به ترتیب با دارا بودن نسبت HD/CD برابر با ۳/۱، ۲/۳۴ و ۲/۱۳ بعد از گذشت ۱۲روز قدرت بالایی از نظر انحلال فسفات معدنی کم‌محلول داشتند و دو باکتری *Enterobacter* sp. S16-3 و *P. fluorescens* Tabriz به ترتیب با دارا بودن نسبت‌های ۱/۸۷ و ۱/۸۴ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. دو باکتری متعلق به جنس *باسیلوس* یعنی گونه‌های *B. firmus* و *B. megaterium* هیچ هاله‌ای تولید نکردند. هیچ کدام از باکتری‌های فوق قادر به تحمل تیمار دمایی ۵۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۶ ساعت نبودند.

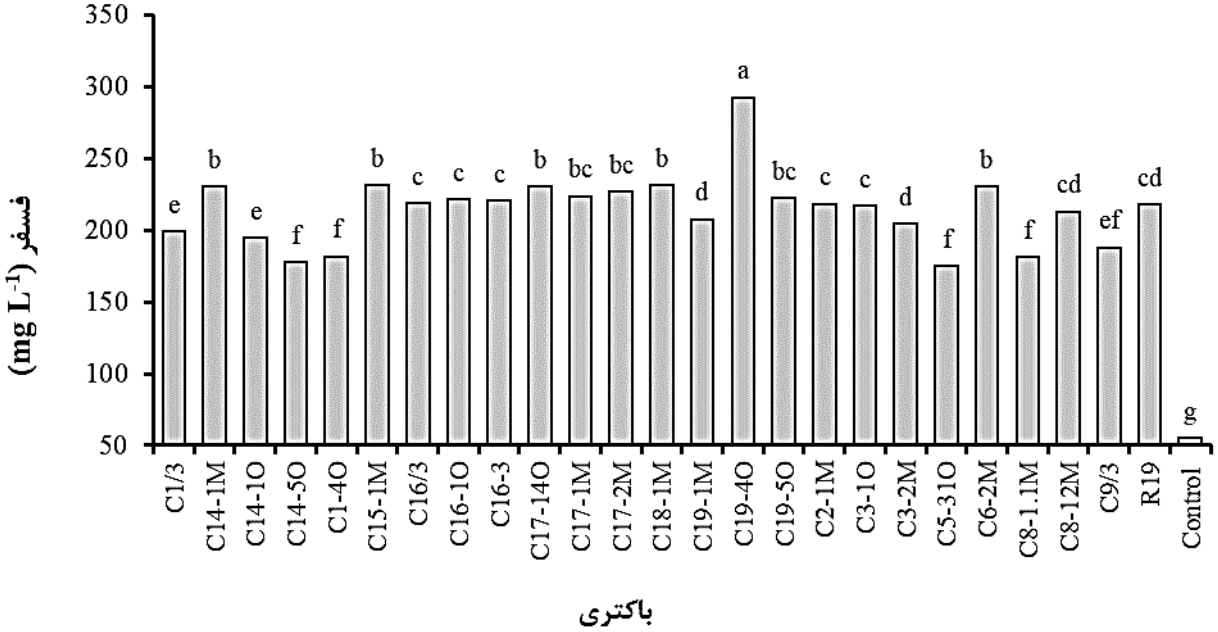
آزمون کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول در دمای ۲۸ درجه سلسیوس

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین جدایه‌ها ازلحاظ قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول (تری‌کلسیم‌فسفات) در محیط اسپربر مایع تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. جدایه C19-4O

www.SID.ir

Archive of SID

بیشترین میزان حل‌کنندگی با مقدار ۲۹۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر و جدایه‌های C5-3.1O، C14-5O، C8-1.1M و C1-4O کمترین میزان حل‌کنندگی (۱۷۵/۲ ، ۱۷۷/۸۶، ۱۸۱/۱ و ۱۸۱/۹۱ میلی‌گرم بر لیتر) داشتند. حل‌کنندگی ۲۵ جدایه در محدوده ۱۷۵/۲–۲۹۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر قرار داشت (شکل ۵).



شکل ۵: توان حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش کمی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات.

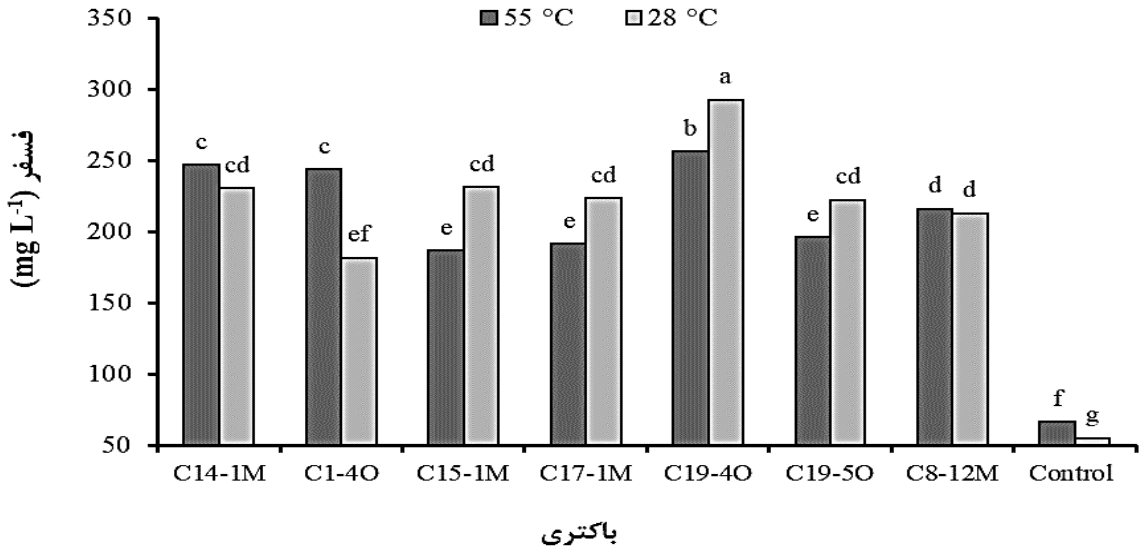
سلطانی (۲۰۰۸) با بررسی ۹۰ نمونه خاک ریزوسفری گندم، تعداد ۲۵ جدایه *Pseudomonas* و ٤٤ جدایه *Flavobacterium* را جداسازی و خالص نمود. بنا به گزارش وی، توانایی حل‌کنندگی فسفات این جدایه‌ها در محیط کشت اسپربر، با استفاده از منبع تری‌کلسیم فسفات و بعد از ۱۲۰ ساعت از ۱۲۹/۹ تا ۳۸٦/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. 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 Ba1 و Ba2 از بارور۲، Bio1، Bio2، Bio3 و Bio4 از بیوسوپرفسفات، SN1 و SN2 از سوپرنیتروپلاس و N1، N2، N3 ، N4 و N5 از نیتروکسین 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، جدایهBa1 با ایجاد بیشترین نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی (۳/۲) و انحلال فسفات به میزان ٦۰٦/٤ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین توان انحلال فسفر بود. توان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های ذکر شده به روش کمی در محدوده ۷۷/۱۵– ٦۰٦/٤ میلی گرم بر لیتر بود (خوشرو و همکاران، ۱۳۹٤). در یک مطالعه که برای جداسازی باکتریهای حل‌کننده فسفات در زمین‌های کشاورزی هند (منطقه اوتاراکند) صورت گرفت. از ۸ ایزوله رشد کرده در محیط جامد Pikovskaya حاوی تری‌کلسیم‌فسفات، ۳ جدایه دارای نسبت HD/CD بالای ٤ بودند و بالاترین میزان حل‌کنندگی فسفر در روش کمی نیز در بین این جدایه‌ها ۳۰۵/٤۹ µg/ml بود (پاندە و همکاران ۲۰۱۷).

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی کم‌محلول در دمای ۵۵ درجه سلسیوس

جدول تجزیه واریانس توان انحلال فسفات از منبع کم محلول تری‌کلسیم‌فسفات در روش کمی و تحت تیمار دمایی ۵۵ درجه سلسیوس برای ۷ باکتری متحمل به گرما نشان داد که تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بین جدایه‌ها از این نظر وجود دارد (جدول ۵). باکتری‌های C19-4O، C14-1M و C1-4O به‌ترتیب با مقادیر ۲۵۶/٤٤، ۲٤۷/۱۲ و ۲٤٤/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر، بیشترین انحلال را در شرایط تیمار دمایی ۵۵ درجه سلسیوس داشتند. مقادیر انحلال فسفات کم‌محلول توسط همین جدایه‌ها در شرایط دمای عادی به‌ترتیب ۲۹۲/۸۹، ۲۳۰/۵۲ و ۱۸۱/۹۱ میلی‌گرم بر لیتر بود. نمودار مقایسه‌ای توان انحلال فسفات کم محلول به روش کمی تحت تیمار گرما و معمولی در شکل ٦ آورده شده است.



شکل ۶: مقایسه توان حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش کمی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات در دمای ۲۸ و ۵۵ درجه سلسیوس.

با توجه به نمودار شکل ٦ می‌توان پی برد که از بین باکتری‌های متحمل به گرما در محیط مایع، همانند روش نیمه‌کمی دو باکتری C19-4O و C1-4O دارای توان انحلال بالایی بوده ولی باکتری C8-12M که در محیط جامد دارای انحلال بالایی نسبت به جدایه C14-1M بود، دیده می‌شود که در محیط مایع این روند برعکس شده و جایگاه این دو باکتری عوض می‌شود. دلیل این امر می‌تواند به سرعت رشد متفاوت این دو باکتری نسبت به زمان در دو محیط جامد و مایع مربوط باشد. چیزی که در شکل ۷ قابل توجه است اثر افزایشی گرما بر قابلیت انحلال فسفات باکتری C1-4O هست. به نظر می‌رسد که ژن‌های مرتبط با انحلال فسفات در این جدایه کاملاً تحت تاثیر مثبت گرما قرار دارند. در یک بررسی روی ۵ باکتری (جدایه‌های RPS4، RPS6، RPS7، RPS8 و RPS9) حل‌کننده فسفات جدا شده از خاکهای بومی مشخص شد که توان انحلال فسفات کم‌محلول از منبع تری‌کلسیم‌فسفات بعد از ۱٤٤ ساعت توسط این جدایه‌ها در محدوده ۱۹٦/٦–۵۵۹/۷ میلی‌گرم بر لیتر بود که از بین ۵ باکتری، دو باکتری حل‌کننده فسفات (RPS7 و RPS9) توان تحمل دمای ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱٦ ساعت را داشتند (خوشرو و ساریخانی ۱۳۹۷).

شناسایی جدایه‌های برتر متحمل گرما

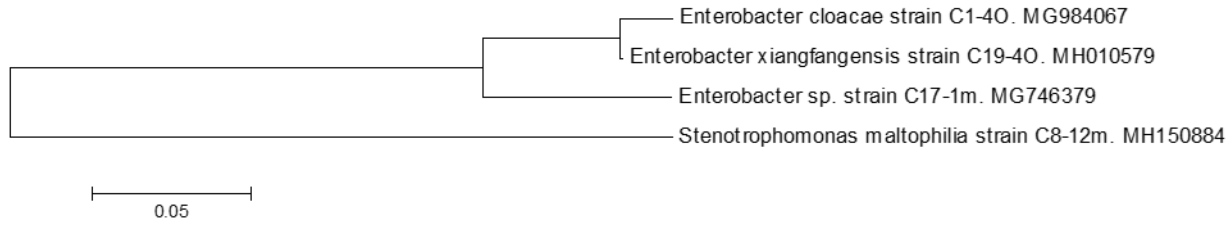
www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به هدف آزمایش که شناسایی باکتری‌های متحمل گرما با توان حل‌کنندگی بالای فسفات کم‌محلول می‌باشد لذا از بین جدایه‌های متحمل گرما (۷ جدایه از بین ۲۵ جدایه کل) و باتوجه به نتایج بدست آمده از آزمون‌های انحلال فسفات کمی و نیمه‌کمی تحت تیمار دمای بالا و دمای عادی، جدایه‌های C19-4O، C1-4O ، C8-12M و C17-1M انتخاب و مورد شناسایی قرار گرفتند. نتیجه شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی باکتریها در جدول ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۲: نتایج تست‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی باکتریهای منتخب

ردیف	سویه باکتری	اکسیداز	کاتالاز	گلوکز	لاکتوز	ژلاتین	سیترات	اوره آز	نیترات ریداکتاز	نوع گرم	شکل	شناسایی
۱	C19-4O	-	+	+	+	-	+	-	-	-	باسیل ریز	*Enterobacter xiangfangensis*
۲	C1-4O	-	+	+	-	+	+	-	-	-	باسیل	*Enterobacter cloacae*
۳	C8-12M	+	+	+	+	+	+	-	-	-	کوکو باسیل	*Stenotrophomonas maltophilia*
٤	C17-1M	-	+	+	+	-	+	-	+	-	باسیل ریز	*Enterobacter hormaechei*



شکل ۷: درخت فیلوژنتیکی باکتریها همراه با کد دسترسی

نتیجه‌گیری کلی

این آزمایش با هدف بررسی توانایی انحلال فسفر ۱۵۰ جدایه باکتری بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز، تحت تیمارهای دمایی ۲۸ و ۵۵ درجه سلسیوس انجام گرفت تا باکتری‌های حل‌کننده فسفات متحمل گرما گزینش شوند. نتایج نشان داد که تنها ۲۵ جدایه باکتری قادر به تشکیل هاله شفاف و انحلال فسفات کم‌محلول بودند. از میان ۲۵ جدایه نیز تنها ۷ جدایه تحت دمای ۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱٦ ساعت زنده ماندند. نسبت قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) این باکتری‌ها مشخص کرد که از بین ۷ باکتری، باکتریهای C1-4O، C19-4O و C8-12M به ترتیب با دارا بودن مقادیر ۲/۵، ۲/٤۵ و ۲/۱۷ دارای قدرت بالایی از نظر انحلال فسفات معدنی کم‌محلول بودند. جدایه C17-1M در تیمار ۲۸ درجه دارای نسبت HD/CD با مقدار ۱/۸ بود و بعد از تیمار دمایی ۵۵ درجه بمدت ۱٦ ساعت، این نسبت با مقدار ۱/۷۵ حاصل شد و بنظر می‌رسد که توان انحلال فسفات این باکتری بطور ناچیزی تحت اثر دمای بالا قرار گرفته است. لذا می‌توان باکتری C17-1M را بعنوان یک ایزوله متحمل به دمای ۵۵ درجه سلسیوس قلمداد کرد. در ادامه روند عکسی نیز در آزمایش دیده شد به اینصورت که باکتریهای C19-4O، C1-4O و C8-12M که در دمای ۲۸ درجه بترتیب دارای مقادیر ۱/۹، ۱/۸ و ۱/۵۵ برای نسبت HD/CD بودند ولی بعد از اعمال تیمار گرمایی (۵۵ درجه سلسیوس بمدت ۱٦ ساعت)، توانایی این باکتری‌ها رو به فزونی گذاشته و بترتیب مقادیر ۲/٤۵، ۲/۵ و ۲/۱۵ برای نسبت HD/CD حاصل گردید. اینطور می‌توان گفت که این باکتری‌ها متحمل گرما نیستند بلکه

www.SID.ir

Archive of SID

گرمادوست هستند چراکه اثر افزایشی گرما بر روی توانایی این باکتری‌ها در این آزمایش مشخص گردید. در پایان بایستی عنوان نمود هر چند در این آزمایش ما بدنبال باکتریهای متحمل گرما برای استفاده در تولید کودهای میکروبی فسفاته گرانوله بودیم و مشخص شد که باکتری C17-1M برای اینکار مناسب است ولی دستاورد این آزمایش شناسایی باکتری‌های گرمادوست مانند C19-4O، C1-4O و C8-12M بود که برای تولید کودهای میکروبی فسفاته گرانوله مناسب بوده و شناسایی مولکولی این باکتری‌ها نشان داد که متعلق به جنس‌های *Enterobacter* و *Stenotrophomonas* می‌باشند.

منابع مورد استفاده

Afzal A, Ashraf M, Asad SA and Farooq M, 2005. Effect of phosphate solubilizing microorganisms on phosphorus uptake, yield and yield traits of Wheat (*Triticum aestivum* L.) in rain fed area. International Journal of Agriculture and Biological Sciences 7: 2. 207-209.

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

Alikhani HA, Saleh-Rastin N and Antoun H, 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. Plant and Soil 287: 35-41.

Anonymous, 2015. Protocols for Registration of Fertilizers Material. Institute of Soil and Water Research. (In Persian)

Chabot R, Hani A and Cescas PM, 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. Plant and Soil 184: 311-21.

Ghasemi Y, Kianmehr M H, Mirzabe A H and Abooali B, 2013. The effect of rotational speed of the drum on physical properties of granulated compost fertilizer. Physicochemical Problems of Mineral Processing 49 (2):743-755

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

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

Hicks GC, Mc Camy IW and Norton MM, 1977. Studies of fertilizer granulation at TVA. In: Proceedings of the second, International Symposium on Agglomeration, Atlanta, USA.

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

Jeon JS, Lee SS, Kim HY, Ahn TS and Song HG, 2003. Plant growth promoting in soil by some inoculated microorganisms. Journal of Microbiology 271- 276.

Karpagam T and Nagalakshmi PK, 2014. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3(3): 601-614.

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

Khoshmanzar E, Aliasgharzad N, Neyshabouri MR, Khoshru B, Arzanlou M and Lajayer BA, 2019. Effects of *Trichoderma* isolates on tomato growth and inducing its tolerance to water-deficit stress. International Journal of Environmental Science and Technology, 1-10.

Khoshru B, Aliasgharzad N, Jodmand A, 2019a. The effect of pH adjustment of municipal compost on its enrichment with plant growth promoting bacterium "*Enterobacter Cloacae*". Journal of Soil Biology, 7 (1): 103-112. (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Khoshru B and Sarikhani MR and Aliasgharzad N, 2019b. Inoculation effect of some phosphatic microbial fertilizers on nutritional indices of *Zea mays* L. Water and Soil Science, 29 (2): 15-27. (In Persian).

Khoshru B and Sarikhani MR, 2019. Effect of phosphatic microbial fertilizers produced from phosphate solubilizing bacteria on phosphorus uptake and growth of Maize. Iranian Journal of Soil Research, 33 (1): 13-24. (In Persian).

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

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

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

Khoshru B, Sarikhani MR and Aliasgharzad N, 2017b. 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. (In Persian)

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

Malboobi MA, 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. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1471-1477

Motsara MR and Roy RN, 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; Oct 22.

Ostwal KP and Bhide VP, 1972. Solubilization of tricalcium phosphate by soil *Pseudomonas*. Indian Journal of Experimental Biology 10:153–4.

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*. L), International Journal of Agriculture Innovations and Research 5: 929-938

Pozin ME, 1986. Fertilizer Manufacture. Mir publishers. USSR. Moscow.

Reddy BC, Murthy D V S and Rao C D P, 1997. Modeling of a rotary drum granulator for control. Particle and Particle Systems Characterization 14: 257-262.

Rezaeifar J, 2008. Investigation parameters of pellets from cattle manure for extruder design. MSc Thesis. Aboureyhan College. University of Tehran, Tehran, Iran. (In Persian)

Sarikhani MR, Khoshru B and Oustan S, 2016. Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under in vitro conditions. Geomicrobiology Journal 33(9): 832-838.

Sarikhani MR, Oustan S, Ebrahimi M and Aliasgharzad N, 2018. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. European Journal of Soil Science 69(6): 1078-1086.

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

Sherrington PJ and Oliver R, 1981. Globulation Processes in Granulation. Heyden and Son Ltd., London.

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

Son HJ, Park GT, Cha MS and Heo MS, 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel-salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. Bioresource Technology 97: 204-210.

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

www.SID.ir

Archive of SID

Teaumroong N, Wanapu C, Chankum Y, Arjharn W, Sang-Arthit S, Teaimthaisong K and Boonkerd N, 2010. Production and Application of Bioorganic Fertilizers for Organic Farming Systems in Thailand. Microbes at Work, Springer, Berlin Heidelberg.

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

Ziaeyan A, Salim-pour S, Silsipour M and Safari H, 2010. Evaluation of some bio and chemical P- fertilizers in corn. The 1st Iranian Fertilizer Challenges Congress Half a Century of the Fertilizer Consumption. 10-12 March, Tehran, Iran. (In Pesian)

Ghanbari, S. 2008. Investigation of influencing parameters on motion and stability angle granular materials in rotating cylinders. MSc Thesis Aboureyhan College University of Tehran, Tehran, Iran. (In Persian)

www.SID.ir