

Optimization of Biofertilizer Formulation for Increasing Phosphorus Solubility by *Aspergillus* FungusMASOUMEH HOSEINI¹, MOHSEN BARIN^{*1}, MOHAMMAD HASSAN RASOULI-SADAGHIANI¹, FARROKH ASADZADEH¹1. Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
(Received: Nov. 26, 2019- Revised: Dec. 30, 2019- Accepted: Dec. 31, 2019)**ABSTRACT**

Phosphorus is one of the macronutrient that its deficiency severely restricts plant growth. One of the simplest and least costly methods of providing phosphorus is direct application of rock phosphate but in calcareous soils it is not very effective due to its low solubility. The use of rock phosphate mixed with sulfur and organic matter along with phosphate solubilizing microorganisms is considered as a method for increasing rock phosphorus solubility. This study aimed to model the effect of different ratios of vermicompost, rock phosphate and sulfur on dissolution and release of phosphorus by *Aspergillus* sp and to optimize the levels of these variables for efficient biofertilizer preparation. Accordingly, 20 experiments were designed using response surface methodology based on central composite design. The effects of different values of vermicompost, rock phosphate and sulfur variables encoded in the constraint (+1, 0, -1) on the dissolution rate of phosphorus were modeled. The results showed a high efficiency ($R^2 = 0.8841$) of the central composite design model in estimating P dissolution. The results also indicated that vermicompost interaction with sulfur ($p < 0.05$) and interaction of rock phosphate with sulfur ($p < 0.05$) were significant. The results of the statistical analysis of the central composite model coefficients indicated that the vermicompost, vermicompost*sulfur and rock phosphate*sulfur additives had a positive and incremental effect on the phosphorus solubility. According to prediction of optimum conditions for phosphorus solubilization, 58% vermicompost, 23.3% rock phosphate and 18.7% sulfur resulted in maximum phosphorus solubilization (773.04 mg / kg) by *Aspergillus* sp. in microbial fertilizer.

Keywords: Modelling, Phosphate Solubilizing Fungus, Central Composite Design, Biofertilizer.

بهینه‌سازی فرمولاسیون کود زیستی برای افزایش انحلال فسفر توسط قارچ اسپرژیلوس

معصومه حسینی^۱، محسن برین^{۱*}، محمدحسن رسولی صدقیانی^۱، فرخ اسدزاده^۱

۱. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۵ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۱۰/۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰)

چکیده

فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف بوده که کمبود آن رشد گیاه را به شدت محدود می‌کند. یکی از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش‌های تأمین فسفر گیاه کاربرد مستقیم خاک‌فسفات می‌باشد اما در خاک‌های آهکی به علت حلالیت ناچیز آن چندان موثر نیست. استفاده از خاک‌فسفات مخلوط‌شده با گوگرد و مواد آلی به همراه ریزجانداران حل‌کننده‌های فسفات از جمله این راهکارها محسوب می‌شوند. این مطالعه با هدف مدل‌سازی بررسی تأثیر نسبت‌های مختلف ورمی‌کمپوست، خاک‌فسفات و گوگرد بر میزان انحلال و آزادسازی فسفر توسط قارچ اسپرژیلوس و ارائه سطوح مطلوب این متغیرها برای تهیه کود زیستی کارآمد انجام شد. بر این اساس تعداد ۲۰ آزمایش با استفاده از روش سطح پاسخ بر مبنای طرح مرکب مرکزی تعریف شد و اثر مقادیر مختلف متغیرهای ورمی‌کمپوست، خاک‌فسفات و گوگرد و به صورت کدبندی شده در محدوده‌ی (+1، 0، -1) بر میزان انحلال فسفر بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده کارآمدی بالای ($R^2 = 0.8841$) مدل طرح مرکب مرکزی در برآورد انحلال فسفر بود. بر اساس نتایج، برهمکنش ورمی‌کمپوست با گوگرد ($p < 0.05$) و برهمکنش خاک‌فسفات با گوگرد ($p < 0.05$) معنی‌دار بود. نتایج تحلیل آماری ضرایب مدل طرح مرکب مرکزی حاکی از اثر مثبت و فزاینده ورمی‌کمپوست، ورمی‌کمپوست × گوگرد و خاک‌فسفات × گوگرد بر افزایش انحلال فسفر می‌باشد. بر اساس پیش‌بینی شرایط بهینه برای انحلال فسفر، مقادیر ۵۸ درصد ورمی‌کمپوست، ۲۳/۳ درصد خاک‌فسفات و ۱۸/۷ درصد گوگرد منجر به ماکزیمم انحلال فسفر (۷۷۳/۰۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) توسط قارچ اسپرژیلوس در کود میکروبی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مدل‌سازی، قارچ حل‌کننده فسفر، طرح مرکب مرکزی، کود زیستی.

مقدمه

فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر محدودکننده رشد گیاهان می‌باشد. اما حلالیت ترکیبات فسفر در خاک بسیار کم بوده و بخش قابل توجهی از فسفر خاک به شکل فسفات‌های نامحلول می‌باشد (Abd-Alla, 1994). از سوی دیگر با مصرف کودهای شیمیایی حاوی فسفر نیز بخش قابل‌ملاحظه‌ای از فسفر به شکل ترکیب‌های نامحلول تبدیل شده و در خاک تثبیت می‌شود. بنابراین خاک‌های کشاورزی حاوی مقادیر زیادی از ذخایر فسفر نامحلول بوده و آزادسازی فسفر از فرم‌های نامحلول و تثبیت‌شده در خاک به منظور افزایش قابلیت‌فراهمی فسفر برای گیاهان زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Rodríguez and Fraga, 1999). در کشاورزی سنتی کاربرد کودهای شیمیایی محلول در آب مثل سوپرفسفات معمول می‌باشد اما در کشاورزی ارگانیک کاربرد این کودها قابل‌پذیرش نیست. بنابراین در این روش کاربرد خاک-فسفات (ترکیب نامحلول فسفر) به‌طور وسیع برای افزایش فسفر خاک استفاده می‌شود (Evans et al., 2006). استفاده از پتانسیل

ریزجانداران کارآمد حل‌کننده فسفات‌های نامحلول یکی از راهکارهای مهم در تأمین نیاز فسفوری گیاهان است در این میان ریزجانداران حل‌کننده فسفات نقش بسیار مهمی در حلالیت ترکیبات نامحلول فسفر در خاک ایفا می‌کنند؛ به نحوی که شکل‌های معدنی و غیرقابل‌استفاده فسفر خاک، از طریق فرآیندهایی نظیر کیلیت‌نمودن، اسیدسازی و واکنش‌های تبدالی توسط ریزجانداران حل‌کننده فسفات، فرم نامحلول فسفر به شکل محلول تبدیل می‌شود. ریزجانداران حل‌کننده فسفات موجود در خاک علاوه بر اینکه می‌توانند مصرف کودهای شیمیایی حاوی فسفات را کاهش دهند، باعث افزایش جذب فسفر توسط گیاهان نیز می‌شوند (Seilsepour et al., 2002). نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که از بین ریزجانداران حل‌کننده فسفات، قارچ‌ها از توان بالاتری در مقایسه با باکتری‌ها برخوردارند (Kucey, 1983; Kucey and Legget, 1989). Kucey (1983) ثابت کرد که توانایی قارچ‌ها برای حل کردن فسفات نامحلول ۱۰ برابر باکتری‌هاست.

روش‌های معمول برای تشخیص شرایط مناسب انحلال فسفر توسط آن‌ها است. در روش‌های مرسوم برای بررسی اثر عوامل مختلف بر شرایط رشد و قابلیت انحلال فسفر توسط میکروارگانیسم‌ها یک عامل تغییر داده شده و عوامل دیگر ثابت نگه‌داشته می‌شوند که این امر علاوه بر زمان بر بودن، پرهزینه نیز بوده و از سوی دیگر تضمینی برای تشخیص شرایط کاملاً بهینه برای فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها ارائه نمی‌دهد (Padmavathi, 2015). در این ارتباط، روش‌های آماری نظیر طرح پلاکت-برمن و روش پاسخ سطح، می‌توانند ابزارهای مفیدی برای تشخیص شرایط بهینه‌ی کشت میکروارگانیسم‌ها به منظور نیل به حداکثر کارایی این ریزجانداران در انجام فعالیت‌های زیستی نظیر انحلال فسفر محسوب شوند (Swetha et al., 2014). روش‌های مذکور، تکنیک‌هایی ترکیبی از روش‌های آماری و ریاضی به منظور طراحی آزمایش‌ها با هدف ایجاد مدل ریاضی پیش‌بینی-کننده هستند که توانایی ارزیابی میزان تاثیر تعدادی عامل به عنوان متغیرهای مستقل را بر روی یک پاسخ مطلوب به عنوان متغیر وابسته دارند (Myers et al., 2002).

با توجه به اهمیت ترکیب و نسبت‌های مواد تشکیل دهنده کودهای زیستی، هدف از این پژوهش مدل‌سازی اثر سطوح مختلف منابع مواد آلی و گوگرد در قالب کود زیستی فسفره بر میزان انحلال سنگ‌فسفات توسط قارچ *Aspergillus sp.* با استفاده از روش پاسخ سطح می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح

قارچ آسپریژیلوس مورد استفاده از بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه تهیه شد. سپس برای تکثیر در محیط کشت PDA به مدت حدود ۹۶ ساعت کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از رشد قارچ‌ها، مایه تلقیح (با جمعیت برابر حدود ۱۰^۸ اسپور قارچ در یک میلی لیتر محلول) آماده شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها و مدل‌سازی انحلال فسفات

ابتدا ورمی کمپوست (مواد آلی)، خاک‌فسفات و گوگرد از الک ۱۴۰ مش (۰/۱۰۵ میلی‌متر) عبور داده شدند (جداول ۱ و ۲).

طرح مرکب مرکزی به منظور مدل‌سازی و پیش‌بینی اثرات سطوح مختلف مواد آلی (ورمی کمپوست)، گوگرد و خاک‌فسفات موجود در کود زیستی، به عنوان متغیرهای مستقل، بر قابلیت انحلال فسفر به عنوان متغیر وابسته مورد استفاده قرار گرفت. دامنه متغیرهای مورد نظر شامل مواد آلی (۵۰-۵ گرم)، گوگرد (۳۰-۰ گرم) و خاک‌فسفات (۸۰-۲۰ گرم) بر اساس مقادیر واقعی

عوامل مختلفی از قبیل منابع کربن و نیتروژن، دما، pH، شرایط تهویه و دوره انکوباسیون در کارایی حل‌کننده‌های فسفات نقش دارند (Whitelaw, 1999). یکی از روش‌های استفاده از این ریزجانداران حل‌کننده فسفات تولید کود میکروبی می‌باشد. این کود با یک سری مواد (اعم از مواد معدنی، آلی، کودهای شیمیایی و پرکننده‌ها) فرموله شده و معمولاً مقدار و نحوه مصرف آن‌ها مشابه کودهای شیمیایی می‌باشد. کودهای میکروبی فسفات‌گرا نوله از نمونه‌های بارز آن هستند. کود میکروبی فسفات‌گرا است جامد و به شکل گرانوله یا پودری که حاوی میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات بوده و به منظور تامین بخش قابل ملاحظه‌ای از فسفر مورد نیاز گیاهان استفاده می‌شود (Khawazi et al., 2013).

Ziaeyan et al. (2010) در بررسی اثربخشی کود زیستی فسفری (کود فسفات‌گرا میکروبی) در کشت ذرت به مدت سه سال در مزارع چندین استان (فارس، خوزستان و کرخ) نشان داد که در تمام مناطق مورد مطالعه، کاربرد کود شیمیایی موثرتر از بقیه منابع بود و کاربرد کود فسفر اثر معنی‌دار و مثبتی بر عملکرد ذرت داشت. آن‌ها خاطر نشان کردند که کود میکروبی فسفات‌گرا اثراتی در حد سوپرفسفات تریپل داشته و با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. ترکیب کود میکروبی فسفات‌گرا مورد استفاده در این آزمایش از مخلوط ۶۰ درصد خاک‌فسفات، ۲۰ درصد گوگرد، ۱۶ درصد ماده آلی و ۴ درصد سولفات روی تشکیل شده بود که حاوی حداقل ۱۰^۵ باکتری حل‌کننده فسفات *Bacillus coagulans* در هر گرم از کود بود.

Sarikhani et al. (2016) کارایی استفاده و اثربخشی شش باکتری مختلف بر بستر پایه خاک فسفات (۴۵ گرم)، گوگرد (۱۵ گرم) و باگاس (۳۰ گرم) را در آزمایش گلخانه‌ای بر گیاه ذرت مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که کاربرد کودهای میکروبی فسفات‌گرا در گیاه ذرت بر وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی، شاخص کلروفیل، مقدار و جذب فسفر بخش ریشه و بخش هوایی تاثیر کاملاً معنی‌داری (در سطح ۵ درصد) داشت. همچنین برخی تیمارهای کود میکروبی از عملکرد بالاتری نسبت به تیمار کود شیمیایی سوپرفسفات تریپل برخوردار بودند.

به دلیل نقش قابل توجهی که اجزاء پرکننده کود زیستی در انحلال فسفات‌های نامحلول (سنگ‌فسفات) دارند، مطالعات گوناگونی برای شناسایی مؤثرترین بستر کود زیستی در ارزیابی توانایی انحلال فسفر صورت گرفته است (Sangeeta and Nautiyal, 2001). بنابراین بهینه‌سازی بستر و نسبت ترکیبات کود میکروبی یکی از معیارهای مهم برای انحلال فسفر می‌باشد.

ترکیب سطوح مختلف عوامل موثر بر رشد میکروارگانیسم‌ها از

در این رابطه X_i ، x_i و x_0 به ترتیب نشان‌دهنده مقدار گذشته متغیر، مقدار واقعی هر متغیر و میانگین دامنه هر متغیر است. Δx نیز مقدار تغییر گام (Step Change) هر پارامتر می باشد.

و همچنین مقادیر گذشته $(+1, +\alpha, 0, -\alpha, -1)$ که در جدول (۱) ارائه شدند، به نرم‌افزار MINITAB 14 معرفی شد. کدبندی مقادیر واقعی متغیرها با استفاده از رابطه (۱) انجام شد.

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i} \quad (\text{رابطه ۱})$$

جدول ۱- غلظت ترکیبات اصلی موجود در نمونه سنگ فسفات (نتایج ایکس آر اف)

| Cl | SO ₃ | SiO ₂ | MgO | F | Fe ₂ O ₃ | AL ₂ O ₃ | CCE | P ₂ O ₅ | ترکیب سنگ فسفات |
|------|-----------------|------------------|------|------|--------------------------------|--------------------------------|-----|-------------------------------|-----------------|
| درصد | | | | | | | | | |
| <۰/۱ | ۰/۲۲ | ۱۶/۱ | ۰/۸۳ | ۰/۶۲ | ۲/۱۶ | ۴/۲۵ | ۴۷ | ۷/۳ | |

جدول ۲- نتایج تجزیه ورمی کمپوست

| پتاسیم | فسفر | C/N | نسبت | نیتروژن | کربن آلی | EC | pH | نمونه |
|--------|------|------|------|---------|----------|--------------------------|-------|-------------|
| درصد | | - | | درصد | | dS m ⁻¹ (۱:۵) | (۱:۵) | ورمی کمپوست |
| ۰/۴ | ۰/۵۶ | ۱۲/۷ | | ۲/۰۳ | ۲۵ | ۱/۶۳ | ۷/۹ | |

تلقیح قارچ آسپرژیلوس (با جمعیت ۱۰^۸ اسپور در هر میلی‌لیتر) داخل هر بسته (کیسه‌های پلی‌اتیلن) ریخته و دهانه بسته‌ها پرس شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ماه در دمای ۲۸±۲ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. در پایان زمان آزمایش، مقدار فسفر محلول با روش مولیبدات-وانادات و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Cotteni, 1980). تجزیه و تحلیل‌های مربوط به مدل‌سازی طرح مرکب مرکزی با استفاده از نرم‌افزار MINITAB 14 صورت گرفت.

نرم‌افزار مذکور، بر اساس دامنه معرفی شده و همچنین تعداد متغیرهای مستقل، مجموع ۲۰ آزمایش و با ترکیب سطوح متفاوتی از مقادیر کدبندی شده این متغیرها را طراحی نمود (جدول ۳). سپس ظرفیت نگهداشت آب ترکیب‌ها، تعیین شد و مقدار آب لازم برای خیس کردن نمونه‌ها محاسبه شد. نمونه‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شدند (Somasegaran and Hoben, 1994). در پایان مقدار آب موردنیاز تعیین شده برای هر ترکیب همراه با ۱ میلی‌لیتر مایه

جدول ۳- دامنه مقادیر آزمایشی متغیرهای مورد استفاده در مدل‌سازی

| دامنه و مقادیر | | | | فاکتور | | متغیر مستقل |
|----------------|------|------|------|--------|----------------|-----------------|
| -۱ | -α | ۰ | +α | +۱ | X _i | |
| ۵ | ۱۴/۱ | ۲۷/۵ | ۴۰/۹ | ۵۰ | x _۱ | مواد آلی (گرم) |
| ۰ | ۶/۱ | ۱۵ | ۲۳/۹ | ۳۰ | x _۲ | گوگرد (گرم) |
| ۲۰ | ۳۲/۲ | ۵۰ | ۶۷/۸ | ۸۰ | x _۳ | فسفات خاک (گرم) |

مدل) و نیز $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ و β_{ij} به ترتیب نشان‌دهنده اثر عرض از مبدأ، اثر توابع خطی، درجه دو و برهمکنش بین متغیرها است. به منظور تفسیر بهتر نتایج مدل و رتبه‌بندی اثر پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی (رابطه ۲)، درصد اثر هر یک از این پارامترها با استفاده از تحلیل پارتو و با کاربرد رابطه (۳) محاسبه شد.

$$P_i = \left[\frac{\beta_i^2}{\sum \beta_i^2} \right] \times 100 \quad i \neq 0 \quad (\text{رابطه ۳})$$

در این رابطه P_i درصد اثر هر یک از متغیرهای طرح مرکب مرکزی و β_i نیز ضرایب معادله چندجمله‌ای (رابطه ۲) است.

در روش پاسخ سطح از یک تابع چندجمله‌ای درجه دوم (رابطه ۱) که شامل ترکیب خطی، درجه دوم و همچنین برهمکنش بین متغیرها بر اساس مقادیر کد شده است، برای پیش‌بینی متغیر وابسته استفاده می‌شود.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_0 X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad i \neq j$$

در این رابطه، Y متغیر پاسخ (انحلال فسفر)، X_i و X_j متغیرهای مستقل گذشته، k تعداد متغیرهای مستقل، ε باقیمانده‌های مدل (اختلاف بین مقادیر مشاهده‌ای و برآورد شده

نتایج و بحث

جدول (۵) ارائه شده است. نتایج جدول (۵) بیانگر این مطلب است که در بخش خطی مدل، اثر متغیرهای مواد آلی (ورمی کمپوست) و سنگ‌فسفات بر غلظت فسفر محلول معنی‌دار شد ($p < 0.01$). در بخش درجه دو نیز تنها گوگرد تأثیر معنی‌داری بر انحلال فسفر توسط قارچ داشت ($p < 0.05$). در ارتباط با اثرات متقابل متغیرهای مستقل با توجه به مقادیر آماره p ، برهمکنش مواد آلی (ورمی کمپوست) با گوگرد ($p < 0.05$) و گوگرد با سنگ‌فسفات معنی‌دار شد (جدول ۵).

جدول ۵- ضرایب تابع چندجمله‌ای طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی غلظت فسفات محلول

| بخش مدل | پارامترهای مدل | میانگین مربعات تصحیح شده | آماره F | آماره P |
|----------|----------------|--------------------------|---------|---------|
| ثابت مدل | ثابت | ۲۹۱۶۳ | ۸/۴۷ | ۰/۰۰۱ |
| خطی | OM | ۱۲۶۱۲۸ | ۳۶/۶۵ | ۰/۰۰۰۰ |
| | S | ۲۰۲ | ۰/۰۶ | ۰/۸۱۳ |
| | RP | ۵۳۵۵۸ | ۱۵/۵۶ | ۰/۰۰۳ |
| درجه دو | OM × OM | ۹۶۵ | ۰/۲۸ | ۰/۶۰۸ |
| | S × S | ۳۴۴۱۸ | ۱۰ | ۰/۰۱ |
| | RP × RP | ۶۱۳ | ۰/۱۸ | ۰/۶۸۲ |
| | OM × S | ۲۷۳۲۰ | ۷/۹۴ | ۰/۰۱۸ |
| برهمکنش | OM × RP | ۱۸۰۰ | ۰/۵۲ | ۰/۴۸۶ |
| | S × RP | ۱۸۸۰۲ | ۵/۴۶ | ۰/۰۴۲ |

OM, S و RP به ترتیب نشان‌دهنده مواد آلی، گوگرد و خاک فسفات می‌باشند.

بر اساس نتایج ارائه‌شده در جدول (۵) برای معنی‌داری هر یک از ضرایب تابع چند جمله‌ای طرح مرکب مرکزی و با در نظر گرفتن ضرایب دارای اثر معنی‌دار تابع پیش‌بینی‌کننده، مقدار فسفر محلول به صورت رابطه (۴) قابل ارائه خواهد بود. در این رابطه X_1 ، X_2 و X_3 به ترتیب مربوط به مقادیر کد شده مواد آلی، گوگرد و خاک‌فسفات می‌باشند.

(رابطه ۴)

$$\text{Dissolved P (mg.kg}^{-1}\text{)} = 504.4 + 161.6X_1 - 105.3X_2 - 6.5X_3 - 23.1X_1^2 - 18.4X_2^2 - 138.2 X_3^2 - 42.4 X_1 X_2 + 165.4 X_1 X_3 + 137.1 X_2 X_3$$

$$R^2 = 0.8841$$

رابطه (۴) که بر مبنای نتایج تحلیل آماری ضرایب مدل طرح مرکب مرکزی خلاصه شده است، حاکی از اثر مثبت و فزاینده‌ی ورمی کمپوست بر افزایش انحلال فسفر است. به منظور ارزیابی کارایی مدل حاصل از طرح مرکب مرکزی (رابطه ۴)، مقدار فسفر اندازه‌گیری شده در آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی در مقابل میزان فسفر پیش‌بینی‌شده با مدل طرح مرکب مرکزی ترسیم شد (شکل ۱). این شکل بیانگر آن است که مدل طرح

ترکیب آزمایش‌های مورد نیاز بر مبنای طرح مرکب مرکزی با سه متغیر ورمی کمپوست، خاک‌فسفات و گوگرد در جدول (۴) ارائه شده است. در این جدول، مقدار فسفر محلول اندازه‌گیری شده برای هر آزمایش نیز ارائه شد. بر اساس نتایج، بیشترین انحلال فسفر (۶۶۷/۳ میلی گرم در کیلوگرم) مربوط به سطح +۱ مواد آلی (۵۰ درصد)، سطوح میانه گوگرد (۱۵ درصد) و خاک‌فسفات (۵۰ درصد) بود همچنین کمترین مقدار انحلال (۲۳۳/۶ میلی گرم در کیلوگرم) مربوط به سطح -۱ مواد آلی (۵ درصد)، سطوح میانه گوگرد (۱۵ درصد) و خاک‌فسفات (۵۰ درصد) بود (آزمایش ۲، جدول ۴).

جدول ۴- ماتریس مقادیر متغیرهای کد شده در مدل‌سازی روش طرح مرکب مرکزی

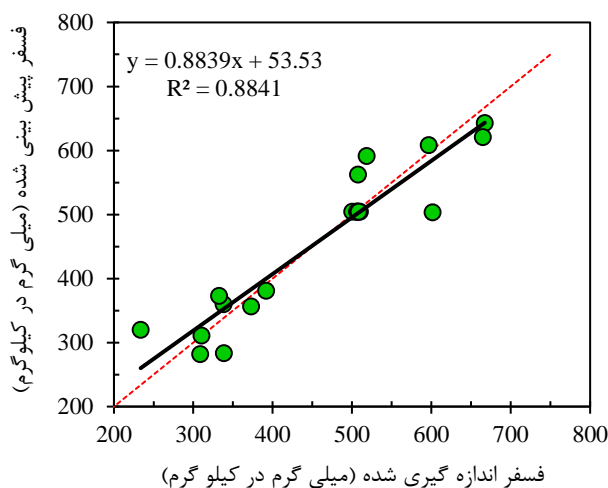
| شماره آزمایش | مقادیر کد شده متغیرها | | | فسفات محلول (mg kg ⁻¹) |
|--------------|-----------------------|----------------|-----------|------------------------------------|
| | مواد آلی (OM) | خاک‌فسفات (RP) | گوگرد (S) | |
| ۱ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۱/۰۰ | ۳۳۸/۱ |
| ۲ | ۱/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۶۶۷/۳ |
| ۳ | ۰/۵۹ | ۰/۵۹- | ۰/۵۹- | ۵۹۶/۷ |
| ۴ | ۰/۵۹ | ۰/۵۹- | ۰/۵۹ | ۶۶۴/۹ |
| ۵ | ۰/۵۹- | ۰/۵۹- | ۰/۵۹- | ۶۰۱/۵ |
| ۶ | ۰/۵۹- | ۰/۵۹ | ۰/۵۹ | ۳۳۸/۵ |
| ۷ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۵۰۶/۲ |
| ۸ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۵۰۶/۲ |
| ۹ | ۰/۰۰ | ۱/۰۰- | ۰/۰۰ | ۵۱۸/۴ |
| ۱۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۱/۰۰- | ۳۳۲/۶ |
| ۱۱ | ۰/۵۹ | ۰/۵۹ | ۰/۵۹ | ۵۰۷/۶ |
| ۱۲ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۵۰۰/۱ |
| ۱۳ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۵۱۰/۰ |
| ۱۴ | ۰/۵۹- | ۰/۵۹ | ۰/۵۹- | ۳۱۰/۳ |
| ۱۵ | ۰/۵۹ | ۰/۵۹ | ۰/۵۹- | ۳۷۲/۸ |
| ۱۶ | ۰/۵۹- | ۰/۵۹- | ۰/۵۹ | ۳۰۸/۵ |
| ۱۷ | ۱/۰۰- | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۲۳۳/۶ |
| ۱۸ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۵۰۶/۲ |
| ۱۹ | ۰/۰۰ | ۱/۰۰ | ۰/۰۰ | ۳۹۱/۹ |
| ۲۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۵۰۸/۴ |

مقادیر واقعی مقادیر کد شده +۱، ۰، ۰/۵۹- و -۱ برای مواد آلی به ترتیب ۵۰، ۴۰/۵، ۲۷/۵، ۱۴/۱ و ۵ گرم و برای گوگرد به ترتیب ۳۰، ۲۳/۹، ۱۵، ۶/۱ و صفر گرم و همچنین برای خاک‌فسفات به ترتیب ۸۰، ۶۷/۸، ۵۰، ۳۲/۲ و ۲۰ گرم بود.

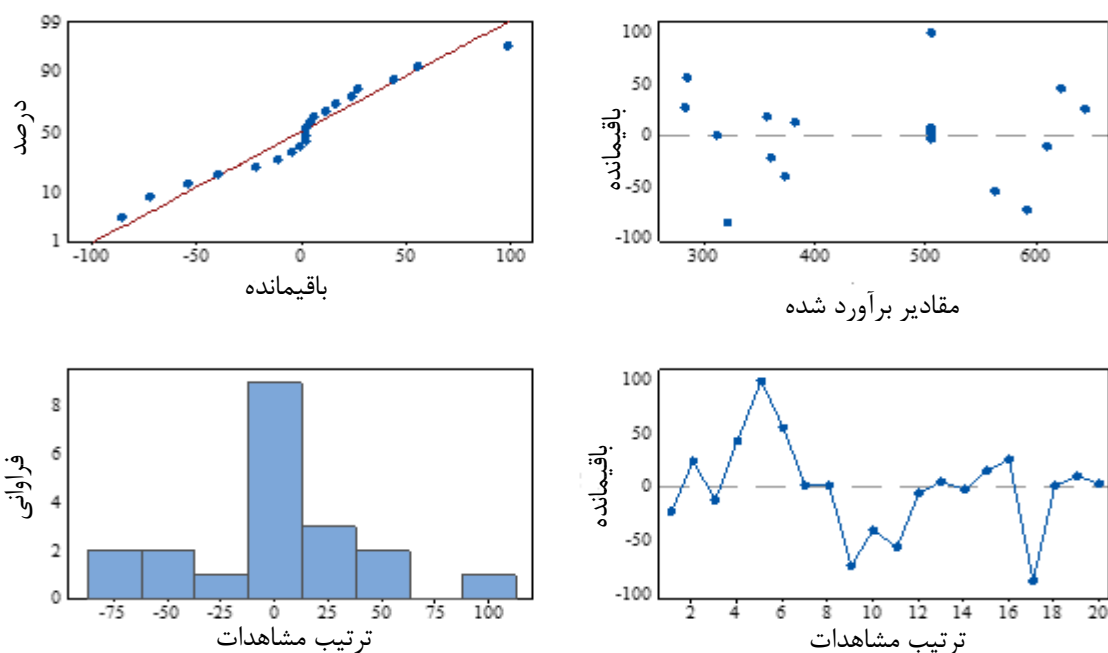
تجزیه واریانس مربوط به مدل طرح مرکب مرکزی در

طرح مرکب مرکزی نیز نرمال بوده و بر اساس علامت (مثبت و یا منفی بودن) مقادیر باقیمانده مدل می‌توان نتیجه گرفت که مدل مذکور فاقد بیش‌برآورد و یا کم‌برآوردی سیستماتیک بوده و جهت خطای آن تابعی از مقدار فسفر محلول نبوده و حالت تصادفی دارد.

مرکب مرکزی به طور مطلوبی مقدار فسفر را برآورد نموده و می‌توان گفت که ۸۸/۴۱ درصد از تغییرات مقدار انحلال فسفر توسط این مدل قابل تبیین است. همچنین براساس شکل (۲)، توزیع مقادیر باقیمانده مدل



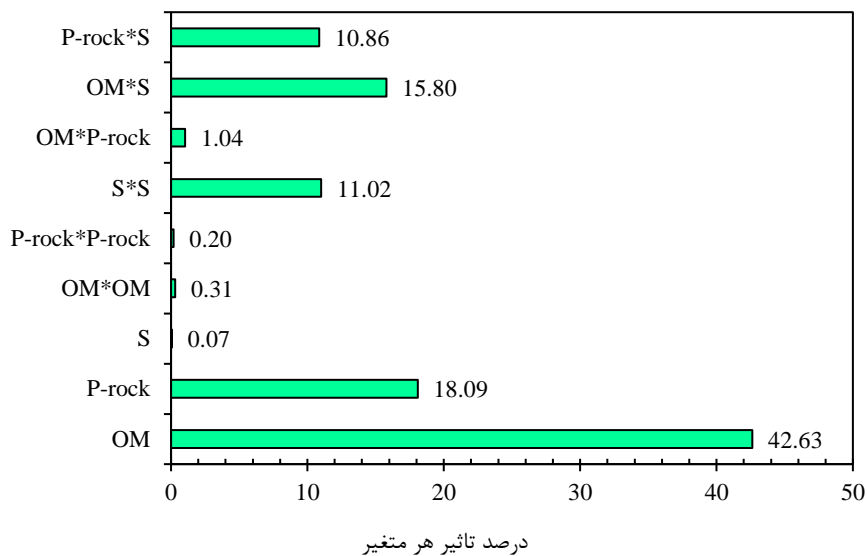
شکل ۱- مقایسه غلظت فسفات محلول مشاهده‌ای و پیش‌بینی شده با استفاده از مدل طرح مرکب مرکزی



شکل ۲- توزیع باقیمانده‌های مدل طراحی ترکیبی مرکزی

و توان دوم گوگرد بیشترین تأثیر را بر میزان انحلال فسفر مشاهده‌ای داشتند. به طوری که درصد اثر این پنج متغیر به ترتیب برابر با ۴۲/۶۳، ۱۸/۰۹، ۱۵/۸۰، ۱۱/۰۲ و ۱۰/۸۶ بوده و مجموع درصد اثرات این پنج متغیر نیز برابر با ۹۸/۴ درصد بود.

برای رتبه‌بندی اثر پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی (رابطه ۲)، درصد اثر هر یک از پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی در شکل (۳) نشان داده شده است. از بین متغیرهای مستقل بررسی شده، به ترتیب مواد آلی (ورمی کمپوست)، سنگ-فسفات، برهمکنش بین مواد آلی و گوگرد، سنگ‌فسفات و گوگرد



شکل ۳- نتایج تحلیل پارتو برای مقایسه اثر پارامترهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی بر انحلال فسفر

که برخی از قارچ‌ها و باکتری‌های هتروتروف، از مواد آلی به عنوان منبع کربن استفاده کرده و اسیدهای آلی نظیر اسید سیتریک، اسید بوتیریک، اسید اگزالیک، اسید مالونیک و اسید لاکتیک تولید کنند. اسیدهای آلی با کاهش pH و کلاته کردن باعث انحلال خاک فسفات و افزایش قابلیت جذب فسفر موجود در آن می‌شوند. قدرت اسید، میزان کلسیم محلول، نوع و موقعیت لیگاند‌های کلات‌کننده از عواملی هستند که بر میزان فسفر آزاد- شده مؤثر واقع می‌شوند (Sagoe *et al.*, 1998).

همچنین بر اساس نتایج به دست آمده از شکل (۴ ب) افزایش گوگرد به ویژه در حضور ماده آلی زیاد، سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار فسفر محلول شده است. هرچند در مقادیر کم ماده آلی نیز تاثیر مثبتی بر افزایش فسفر محلول دارد لیکن با افزایش ماده آلی تاثیر افزایش گوگرد بر فسفر محلول تشدید می‌شود. این روند برای شکل (۴ ج) نیز تقریباً حاکم بوده و تاثیر گوگرد بر افزایش فسفر محلول در مقادیر بالای خاک‌فسفات قابل توجه است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که فسفر محلول با افزایش گوگرد به ویژه در محیط‌های با ماده آلی و خاک‌فسفات کافی، به سرعت افزایش می‌یابد.

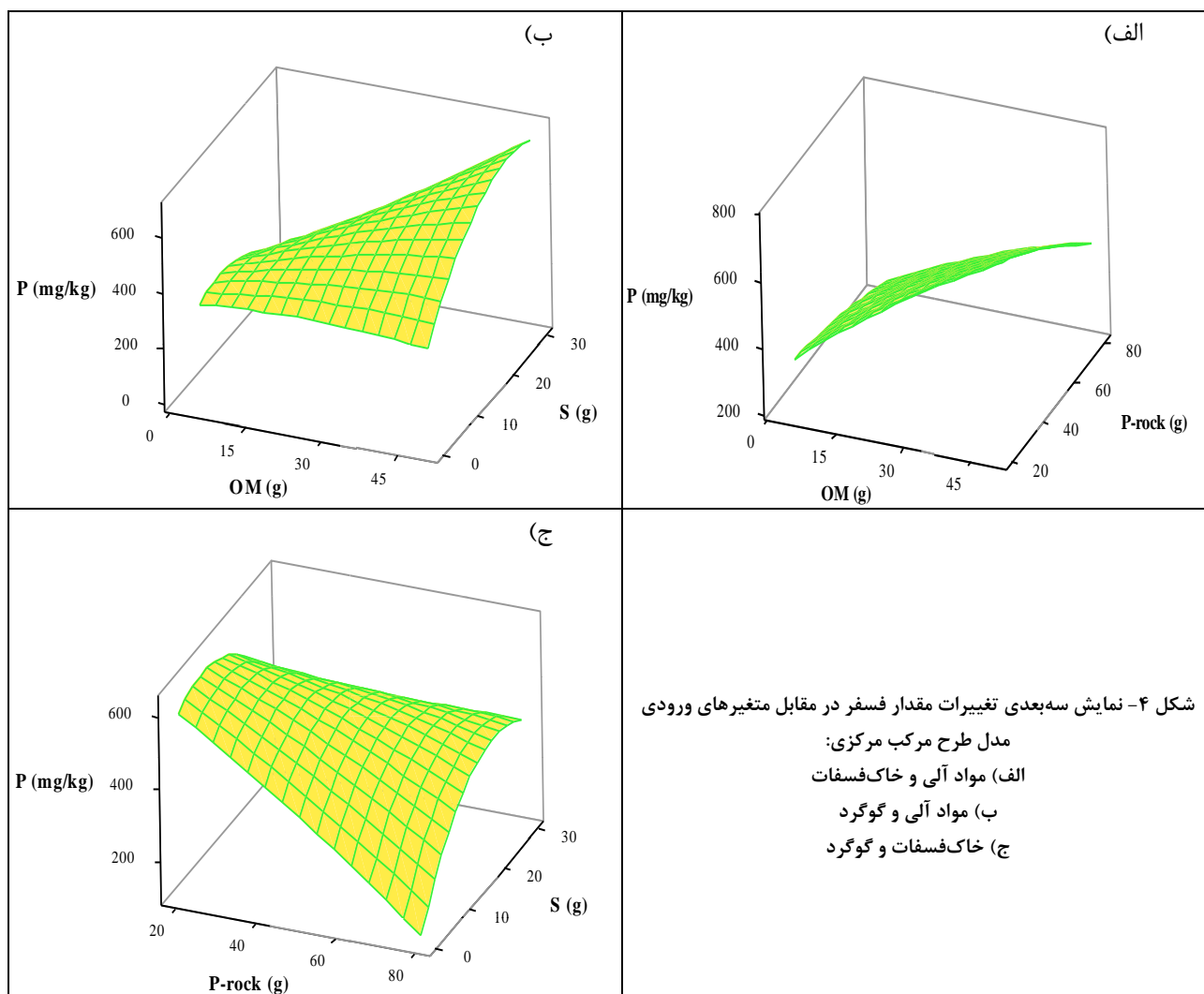
با توجه به اینکه گوگرد خاصیت اسیدی‌زایی دارد لذا استفاده از خاک‌فسفات همراه با گوگرد، مواد آلی و میکروارگانسیم منجر به کاهش pH شده و کاهش pH سبب افزایش انحلال فسفر و آزادسازی تدریجی فسفر از خاک‌فسفات می‌شود (Zapata and Brahim *et al.*, 2017; Roy 2004; Salimpour *et al.*, 2010). ترکیبات مختلف مانند خاک‌فسفات، گوگرد، خاک‌فسفات + گوگرد، سوپر فسفات، سولفات منیزیم و شاهد (بدون ماده افزودنی) را بر رشد و عملکرد گیاه سویا بررسی کردند و بیان

برای نشان دادن اثر ترکیبی متغیرها شامل مواد آلی (ورمی - کمپوست)، گوگرد و سنگ‌فسفات نمودار سه بعدی تغییرات مقدار انحلال فسفر برای این متغیرها به صورت دو به دو و بر اساس مدل طرح مرکب مرکزی ترسیم شده و در شکل (۴) ارائه شد. شکل (۴ الف) بیانگر اثر ترکیبی ورمی کمپوست و سنگ‌فسفات بر مقدار انحلال فسفر می‌باشد. بر اساس این شکل، افزایش ورمی کمپوست در سطوح مختلف خاک‌فسفات باعث افزایش مقدار انحلال فسفر شده است. همچنین افزایش خاک‌فسفات به رغم تاثیر بر افزایش فسفر محلول در مقایسه با ورمی کمپوست، تاثیر کمتری بر انحلال فسفر داشته است.

مطالعات مختلف نشان دادند که عوامل مختلفی از قبیل منابع کربن و نیتروژن، دما، pH، شرایط تهویه و دوره گرماگذاری در کارایی انحلال نقش دارند (Whitelaw, 1999; Pradhan and Sukla, 2006). کربن یکی از منابع غذایی اولیه برای رشد و فعالیت متابولیکی ریزجانداران می‌باشد و وجود آن برای تولید اسیدهای آلی ضروری است اسیدهای آلی تولیدشده به وسیله ریزجانداران حل‌کننده فسفات و همچنین تولید آنزیم فسفاتاز به وسیله این ریزجانداران می‌تواند بر منابع نامحلول فسفات اثر گذاشته و باعث افزایش حلالیت فسفر شود (Saleh Rastin, 1998; Ziaeyan, 2012; Ashrafi-Saeidlou *et al.*, 2016). ورمی کمپوست که حاوی محتوای کربن و عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف بالایی است، از طریق عرضه مقادیر بالایی از عناصر غذایی، رشد و فعالیت‌های متابولیکی میکروارگانسیم‌ها را افزایش داده و منجر به بهبود فعالیت حل‌کنندگی آن‌ها می‌شود (Nancarrow and Taylor, 1998; Shilpa and Brahmprakash, 2016). مصرف مواد آلی همراه با خاک فسفات نیز موجب می‌شود

نیتروژن و فسفر در اندام هوایی نسبت به کاربرد خاک فسفات و گوگرد به تنهایی شد.

داشتند که کاربرد همزمان گوگرد + خاک فسفات سبب افزایش معنی‌دار در عملکرد دانه و اجزای عملکرد سویا و همچنین



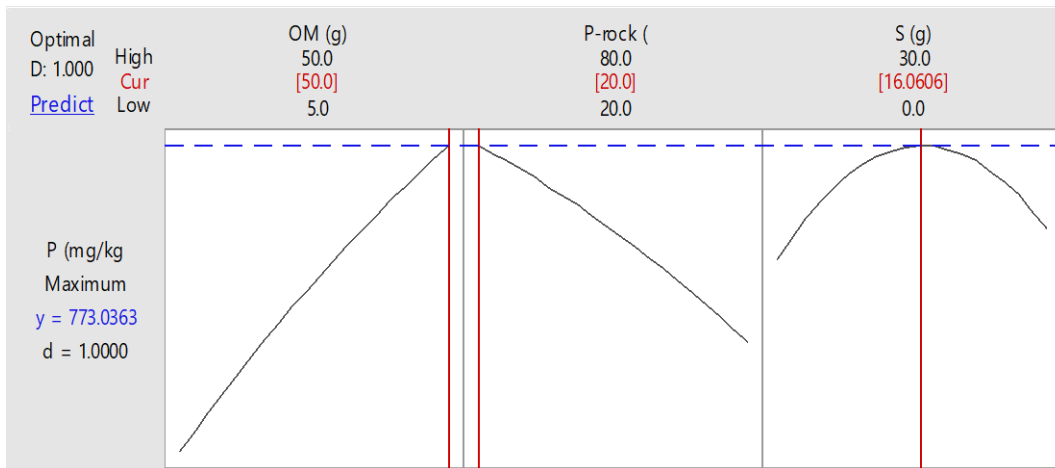
از خاک فسفات آزاد می‌شود و نسبت چهار قسمت از مواد آلی به یک قسمت از خاک فسفات یک ترکیب مؤثر و خوب در آزاد سازی فسفر می‌باشد. همچنین مقدار به دست آمده برای نسبت خاک-فسفات به گوگرد برای بیشینه انحلال فسفر در کود میکروبی ۱/۲۵ به ۱ می‌باشد. Stanisławska-Głubiak *et al.*, (2014) نسبت‌های مختلف خاک فسفات به گوگرد (۳۸:۱ و ۱۰:۱) را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که با افزایش گوگرد، اثربخشی کود افزایش یافته و نسبت ۱۰:۱ مؤثرتر بود. البته بایستی توجه کرد که شرایط متفاوت آزمایش از یک سو و تنوع گسترده کیفیت منابع خاک فسفات و همچنین عوامل فرعی نظیر درجه خردشدگی و حتی تنوع خاک از عواملی هستند که می‌توانند در نسبت بهینه این متغیرها تاثیر داشته باشند.

Attoe and Olsen (1966) نسبت‌های مختلف شامل (۱) به

به منظور تعیین فرمولاسیون بهینه کود زیستی، مدل توسعه داده شده توسط روش طرح مرکب مرکزی مبنای عمل قرار گرفته و بر اساس معنی‌داری عوامل مؤثر بر انحلال فسفر در این مدل، شرایط بهینه برای نیل به حداکثر فسفر محلول تعیین شد. شکل (۵) نشان‌دهنده پیش‌بینی شرایط بهینه برای انحلال فسفر از خاک فسفات در این ترکیب کودی می‌باشد و بیانگر آن است که برای به دست آوردن بیشینه انحلال فسفر (۷۷۳/۰۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) توسط قارچ اسپرزیلوس در هر بسته کود میکروبی، بایستی مقادیر ۵۸ درصد ورمی‌کمپوست، ۲۳/۳ درصد خاک-فسفات و ۱۸/۷ درصد گوگرد استفاده شود. پیش‌بینی شرایط بهینه برای آزادسازی فسفر نیز نشان داد که نسبت مواد آلی به خاک فسفات برابر ۲/۵ به ۱ به دست آمد. Singh and Amberger (1991) اظهار داشتند که با افزایش مواد آلی، مقدار بیشتری فسفر

که کود خاک فسفات به همراه گوگرد می‌تواند به اندازه سوپرفسفات مؤثر باشد در صورتی که نسبت خاک فسفات به گوگرد بین ۱ به ۱ و ۵ به ۱ در نوسان باشد که با افزایش درجه خرد کردن خاک فسفات، این نسبت ممکن است به ۷ به ۱ افزایش یابد. Stamford *et al.* (2003) نیز تاثیر خاک فسفات به همراه درصد های مختلف گوگرد (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) و تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر رشد گیاه لگوم را مورد بررسی قرار دادند و بیان داشتند که در برداشت دوم، کود خاک فسفات به همراه ۱۵ و ۲۰ درصد گوگرد و تلقیح میکروبی سبب کاهش مقدار pH خاک و افزایش مقدار فسفر قابل جذب شد.

۱ الی ۲۰ به ۱) خاک فسفات به گوگرد را مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که در نسبت های پایین (۱ به ۱ و ۲ به ۱ خاک-فسفات به گوگرد)، مقدار محصول به اندازه استفاده از کود های شیمیایی محلول فسفر بود. Evans *et al.* (2006) گزارش کردند که برای باروری و افزایش فسفر قابل دسترس حتی در خاک های اسیدی، کاربرد گوگرد + خاک فسفات موثرتر از خاک فسفات به تنهایی می باشد. در ضمن عملکرد کاربرد گوگرد ریز و پودری بهتر از گوگرد گرانولار بود. همچنین بیان داشتند که نسبت حداقل ۲ به ۱ (خاک فسفات به گوگرد ریز) مورد نیاز می باشد و نیز برای دستیابی به کارایی بهتر، با افزایش ماده آلی مقدار گوگرد هم بایستی افزایش یابد. در همین رابطه، Rajan (1983) نشان داد



شکل ۵- بهینه‌سازی مقادیر پارامترهای ورودی مدل برای کسب بیشینه غلظت فسفر محلول

فسفر داشت. افزایش گوگرد نیز به ویژه در حضور ماده آلی زیاد سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار فسفر محلول شد. همچنین پیش‌بینی شرایط بهینه برای انحلال فسفر از خاک-فسفات در کود میکروبی و برای به دست آوردن بیشینه انحلال فسفر (۷۷۳/۰۴ میلی گرم بر کیلوگرم) توسط قارچ اسپرژیلوس در هر بسته کود میکروبی، بایستی مقادیر ۵۸ درصد ورمی کمپوست، ۲۳/۳ درصد خاک فسفات و ۱۸/۷ درصد گوگرد استفاده شود. در نهایت کاربرد نسبت ۳/۱: ۱/۲۵: ۱ به ترتیب از راست به چپ ورمی کمپوست: خاک فسفات: گوگرد برای شرایط بهینه آزادسازی فسفر از خاک فسفات در کود میکروبی توسط اسپرژیلوس مناسب می باشد.

نتیجه گیری

در این پژوهش از طرح مرکب مرکزی به منظور پیش‌بینی و بهینه‌سازی سطوح مختلف مواد آلی (ورمی کمپوست)، گوگرد و همچنین خاک فسفات موجود در کود زیستی بر قابلیت انحلال فسفر استفاده شد. نتایج کلی این تحقیق بیانگر تاثیر مطلوب ترکیب کودی استفاده شده (ورمی کمپوست + خاک فسفات + گوگرد) بر توانایی حل‌کنندگی قارچ اسپرژیلوس در مقیاس آزمایشگاهی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش ورمی کمپوست در سطوح مختلف خاک فسفات باعث افزایش مقدار انحلال فسفر شد اما افزایش خاک فسفات به رغم تاثیر بر افزایش فسفر محلول در مقایسه با ورمی کمپوست، تاثیر کمتری بر انحلال

REFERENCES

Abd-Alla, M. H. (1994). Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae. *Letters in Applied Microbiology*, 18(5), 294-296.

Ashrafi-Saeidlou, S., and Rasouli-Sadaghiani, M.H.

Asadzadeh, F. Barin M. (2016). Modeling Phosphate Solubilization by *Pseudomonas fluorescens* Using Response Surface Methodology. *Water and Soil Science*, 26: 299-324. (In Farsi)

- Attoe, O. J., & Olson, R. A. (1966). Factors affecting rate of oxidation in soils of elemental sulfur and that added in rock phosphate-sulfur fusions. *Soil science*, 101(4), 317-325.
- Brahim, S., Niess, A., Pflipsen, M., Neuhooff, D., & Scherer, H. (2017). Effect of combined fertilization with rock phosphate and elemental sulphur on yield and nutrient uptake of soybean. *Plant, Soil and Environment*, 63(2), 89-95.
- Cotteni, A. (1980). Methods of plant analysis. Pp. 64-100. In: Soil and Plant Testing FAO Soil Bulletin.
- Evans, J., McDonald, L., & Price, A. (2006). Application of reactive phosphate rock and sulphur fertilisers to enhance the availability of soil phosphate in organic farming. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 75(1-3), 233-246.
- Khawazi, K., Asgharzadeh, A., Rajali, F., Asadi Rahmani, Besharati, H., & Fallah Nosratabadi, AS. (2013). Instructions on how to investigate bio-fertilizers. SADES Publications, 44 Pp. (In Farsi)
- Kucey, R. M. N. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 63(4), 671-678.
- Kucey, R.M.N., & Leggett, M.E. (1989). Increased yield and phosphorus uptake by canola inoculated with a phosphate-solubilizing isolate of *penicillium bilaj*. *Canadian Journal of Soil Science*, 69: 425-432.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.
- Nancarrow, L., & Taylor, J. H. (1998). *The Worm Book: The Complete Guide to Worms in Your Garden*. Random House Digital, Inc.
- Padmavathi, T. (2015). Optimization of phosphate solubilization by *Aspergillus niger* using plackett-burman and response surface methodology. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(3), 781-793.
- Pradhan, N., & Sukla, L. B. (2006). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10).
- Rajan, S. S. S. (1983). Effect of sulphur content of phosphate rock/sulphur granules on the availability of phosphate to plants. *Fertilizer research*, 4(3), 287-296.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- Sagoe, C. I., Ando, T., Kouno, K., & Nagaoka, T. (1998). Residual effects of organic acid-treated phosphate rocks on some soil properties and phosphate availability. *Soil science and plant nutrition*, 44(4), 627-634.
- Saleh Rastin, N. (1998). Biological Fertilizers. *Iranian Journal Soil and Water Science*, 13: 1-36. (In Farsi)
- Salimpour, S., Khavazi, K., Nadian, H.A., & Besharati, B. (2010). Effect of Rock Phosphate Along With Sulfur and Microorganisms on Yield and Chemical Composition of Canola. *Iranian Journal Soil and Water Science*, 24: 9-19. (In Farsi)
- Sangeeta, M., & Nautiyal, C.S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*, 43:51-56.
- Sarikhani, M.R., Aliasgharzad, N., & Khoshru, B. (2016). Effectiveness of phosphate solubilizing bacteria in the form of phosphate microbial fertilizer on maize. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 94:71-81. (In Farsi)
- Seilsepour, M., Baniani, E., & Kianirad, M. (2002). Effect of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) in reducing the rate of phosphate fertilizers application to cotton crop. Proceedings of the 15th International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization Salamanca University, 16-19 July, Salamanca, Spain.
- Shilpa, M. E., & Brahma Prakash, G. P. (2016). Amendment of carrier with organic material for enhancing shelf life of microbial consortium. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4), 2835-2842.
- Singh, C. P., & Amberger, A. (1991). Solubilization and availability of phosphorus during decomposition of rock phosphate enriched straw and urine. *Biological Agriculture & Horticulture*, 7(3), 261-269.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Preparing a Range of Carrier Materials and Producing Inoculants. In *Handbook for Rhizobia* (pp. 240-248). Springer, New York, NY.
- Stamford, N. P., Santos, P. R. D., Moura, A. M. M. F. D., & Freitas, A. D. S. D. (2003). Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and *Acidithiobacillus* in a soil with low available-P. *Scientia Agricola*, 60(4), 767-773.
- Stanisławska-Glubiak, E., Korzeniowska, J., Hoffmann, J., Górecka, H., Józwiak, W., & Wiśniewska, G. (2014). Effect of sulphur added to phosphate rock on solubility and phytoavailability of phosphorus. *Polish Journal of Chemical Technology*, 16(1), 81-85.
- Swetha, S., Varma, A., & Padmavathi, T. (2014). Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass, α -amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett-Burman experimental design. *3 Biotech*, 4(4), 439-445.
- Whitelaw, M. A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. In *Advances in Agronomy* (Vol. 69, pp. 99-151). Academic Press.
- Zapata, F., & Roy, R. N. (2004). Use of phosphate rocks for sustainable agriculture. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin*, 1-148.
- Ziaeyan, A. (2012). The possibility of biological phosphate fertilizers application in corn cultivation of Fars Province. *Journal of SSB.ir*

Management and Sustainable, 2:111-125. (In Farsi)
Ziaeyan, A. Salim-pour, S. Silsipour, M. & 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. (In Farsi)