تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۴۹، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷ (ص۸۱-۷۱) DOI: 10.22059/ijswr.2018.215308.667533

# بررسی اثربخشی باکتریهای حل‌کننده فسفات در قالب کود میکروبی فسفاته بر گیاه ذرت

**محمدرضا ساریخانی*[۱]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، بهمن خوشرو[۳]**

۱. دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲. استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. کارشناس ارشد، گروه علوم و مهندسی خاک،-دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۲۹/ ۶/ ۱۳۹۵- تاریخ بازنگری: ۱۲/ ۴/ ۱۳۹۶ – تاریخ تصویب: ۱۴/ ۴/ ۱۳۹۶)

## چکیده

امروزه استفاده از کودهای شیمیایی، آلی و زیستی جزء لاینفک کشاورزی به شمار می‌روند، در این میان نیاز به تامین عنصر فسفر برای تولید محصولات کشاورزی لازم و ضروری می‌باشد. استفاده از کودهایی با بستر آلی و شیمیایی و تلفیق آنها با میکروارگانیسم‌های مفید از جمله باکتریهای حل‌کننده فسفات باعث عرضه محصولاتی به نام کودهای میکروبی فسفاته شده است. بر این اساس در این تحقیق کارایی استفاده و اثربخشی ۶ باکتری موجود در بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک به نام‌های (*Pseudomnas* sp. C16-2O، *P. putida* Tabriz، *Pseudomonas fluorescens* Tabriz، *Enterobacter* sp. S16-3، *Bacillus megaterium* JK6 و *B. firmus*) بر بستر پایه خاک فسفات (۴۵ گرم) + گوگرد (۱۵گرم) + باگاس (۳۰ گرم) پس از تامین جمعیت میکروبی اولیه مناسب مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین در این آزمایش باکتری *Pantoea agglomerans* P5 به عنوان باکتری حل‌کننده فسفات مورد استفاده در کود بارور۲ نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آزمایش در مجموع با در نظر گرفتن ۱۷ تیمار در ۴ تکرار که شامل تیمارهای شاهد منفی (بدون کود میکروبی و کود سوپرفسفات)، شاهد مثبت (کود سوپرفسفات تریپل بر اساس آزمون خاک)، کود فسفاته پودری (بدون افزودن باکتری)، کود میکروبی فسفاته تهیه شده از هر شش باکتری در مقادیر هم وزن (۰/۶ گرم) و دو برابر (۱/۲ گرم) مقدار کود سوپرفسفات تریپل توصیه شده بود، انجام شد. نتایج به دست آمده از آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد کودهای میکروبی فسفاته در گیاه ذرت رقم سینگل‌گراس ۷۰۴، 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٪) دارد. تلقیح کودهای میکروبی حاوی باکتریهای محرک رشد گیاه کلنیزاسیون این باکتریها را در ریزوسفر گیاه به دنبال داشته است و شاهد افزایش میانگین پارامترهای اندازه‌گیری شده بودیم. تیمارهای کودی *Enterobacter* sp. S16-3 و *Pseudomonas* sp. C162-O در اکثر پارامترهای اندازه‌گیری شده دارای عملکردی شبیه تیمار *Pantoea agglomerans* P5 بودند و هر سه این تیمارها در اکثر موارد دارای عملکرد بالاتری نسبت به تیمار کود شیمیایی سوپرفسفات تریپل بودند. تیمارهای *P. fluorescens* و *P. putida* هم تا حدودی دارای عملکرد مشابه یکدیگر بودند، البته بایستی عنوان نمود که تیمار میکروبی *B. firmus* در برخی موارد و تیمار *B. megaterium* در اکثر پارامترها دارای عملکرد پایین‌تری نسبت به تیمار بستر بدون باکتری (کنترل منفی) و حتی پایین‌تر از تیمار بدون بستر کود (No Carrier) بودند. لازم به ذکر است که اثر سطوح مختلف مصرف کودی در این پژوهش کاملاً معنی‌دار بود و در اکثر موارد سطح مصرفی ۱/۲ گرم نسبت به سطح مصرفی ۰/۶ گرم باعث افزایش عملکرد حدود دو برابری در گیاه شد.

**واژه‌های کلیدی:** کود میکروبی فسفاته، باکتریهای حل‌کننده فسفات، *سودوموناس*، اثربخشی.

## مقدمه

کودهای شیمیایی یکی از عوامل اصلی حفظ حاصل‌خیزی خـاک می‌باشند. برطرف کردن کمبود فسفات به‌وسیله کاربرد کودهای شیمیایی فسفات پرخطر و گران، چاره‌ای مطلوب و ایده‌آل نمی‌باشد و پیامدهای جدی برای عملیات کشاورزی بعدی ایجاد می‌کند. مقادیر زیادی از کودهای شیمیایی برای تأمین فسفر و نیتروژن خاک استفاده می‌شوند که آلودگی‌های محیطی شدیدی را به وجود می‌آورند (Dai *et al*., 2004). ولی استفاده بیش از اندازه از آن‌ها به‌ویژه هنگامی‌که با عملیات مدیریتی نامناسب مثل سوزاندن بقایای گیاهی همراه شود، میزان ماده آلی خاک را به‌شدت کاهش می‌دهد. این موضوع روی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولـوژیکی خـاک تأثیر

* نویسنده مسئول: rsarikhani@yahoo.com

گذاشته و امکان فرسایش را در این خاک‌ها افـزایش می‌دهد (Davarinejad *et al*., 2004). بخش زیادی از فسفر غیرآلی که به‌صورت کودهای شیمیایی به‌کاربرده می‌شود به‌سرعت تثبیت‌شده و به فرم غیرقابل‌دسترس و غیرقابل‌حل برای گیاه تبدیل می‌شود (Kacar and Katkat, 2010). میزان مصرف کودهای فسفره در کشور حدود ۷۰۰ هزار تن است که بخش اندکی از آن در داخل تولید می‌شود و سالیانه حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ هزار تن از این محصول شیمیایی از خارج وارد می‌گردد (Malakoti, 1995). این در حالی است که سالانه بین ۷۵ الی ۹۰ درصد فسفر اضافه‌شده به خاک به دلیل آهکی بودن اکثر خاک‌ها، وجودpH بالا، تنش خشکی و وجود بی‌کربنات در آب آبیاری و کمبود مواد آلی موجود در خاک و همچنین در اثر ترکیب با یون‌های کلسیم، آلومینیوم و آهن در خاک به‌صورت رسوب درمی‌آید و از دسترس گیاه خارج می‌شود (Kacar and Katkat, 2010).

استفاده از ریزجانداران خاک‌زی به‌منظور افزایش رشد و تولید گیاهان از اوایل قرن بیستم میلادی ابتدا در آمریکا و روسیه و سپس در کشورهای دیگر آغاز شد ولی به دلیل اثر سریع و آنی کودهای شیمیایی، سهولت در کاربرد و قیمت ارزان آن‌ها، کودهای زیستی مورد استفاده قرار نگرفتند و برای مدت زیادی به بوته فراموشی سپرده شدند. در سی سال اخیر به دلیل آشکار شدن اثرات سوءمصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی و قیمت رو به افزایش آن‌ها مجدداً استفاده از کودهای زیستی در کشاورزی مطرح‌شده است. مطالعات زیادی بر روی امکان استفاده از کودهای زیستی بر روی محصولات متعدد به عمل آمده است (Ehteshami *et al*., 2012; Turk *et al*., 2006 ; Liu & Chen, 2007). نتایج تحقیقات نشان داده است که میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات قادرند در منطقه ریزوسفر فعالیت نموده و با کمک ترشحات ریشه، ترکیبات نامحلول فسفات مانند تری‌کلسیم فسفات را به صورت محلول و قابل‌جذب گیاه درآورند (Kiani, 1995). قارچ‌های میکوریزی و باکتری‌های حل‌کننده فسفات مناسب‌ترین جایگزین کودهای شیمیایی و سازگارترین کودهای زیستی با محیط زیست در کشاورزی پایدار می‌باشند که به دلیل اثرات جداگانه و متقابل روی یکدیگر و گیاهان میزبان، مورد توجه بسیاری از محققین قرارگرفته‌اند (Franco *et al*., 2010; Garbaye, 1994). هدف کشاورزی پایدار توسعه کاربرد کودهای زیستی است. استفاده از کودهای زیستی ازجمله کودهای حاوی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در راستای کشاورزی پایدار ضمن کاهش مصرف کودهای شیمیایی و افزایش برداشت محصولات کشاورزی به جلوگیری از آلودگی و حفظ محیط زیست کمک می‌کند (Malboobi *et al*., 2009 ; Safari, 2014). امروزه به دلیل افزایش اهمیت مسائل زیست‌محیطی توجه بیشتری به کودهای بیولوژیک یا زیستی بـرای جایگزینی کودهای شیمیایی شده اسـت (Kader *et al*., 2002). در واقع کودهای زیستی به مواد حاصلخیز کننده‌ای گفته می‌شود که حاوی تعداد کافی از یک یا چندگونه از موجودات مفید خاکزی هستند که روی مـواد نگه‌دارنده مناسـبی عرضـه می‌شوند (Izquierdo *et al*., 2005). عرضه مواد آلی به خاک، به دلیل پاسخگویی به یکی از بزرگ‌ترین نیازهای گیاه از مزایای بارز این قبیل کودهاست. علاوه بر این، تأمین عناصر غذایی به صورتی کاملاً متناسب با تغذیه طبیعی گیاهان، کمک به تنوع زیستی، تشدید فعالیت‌های حیاتی، بهبـود کیفیـت و حفـظ سلامت محیط‌زیست از مهم‌ترین مزیت‌های کودهای بیولوژیک بـه شمار می‌رود (Rai and Gaur, 1998). عرضه کودهای میکروبی در اوایل دهه ۱۹۷۰ شروع شد. در این راستا چندین کود میکروبی ازجمله IARI microphos در هند (Khan *et al*., 2007)، Phosphobacteria در روسیه و که بعداً در اروپای شرقی و هند مورد استفاده قرار گرفت.

کودهای میکروبی نوعی از کودهای زیستی هستند که در آن بر بستری از مواد آلی- معدنی و شیمیایی از میکروارگانیسم‌های مفید بهره برده می‌شود. یکی از کودهای میکروبی مهم، کود میکروبی فسفاته می‌باشد که به صورت پودری یا گرانوله تهیه و استفاده می‌شود. با توجه به اهمیت فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای محصولات کشاورزی، استفاده از کود میکروبی فسفاته مورد توجه است (Ziaeyan *et al*., 2010). در این نوع کود از سنگ فسفات به عنوان منبع تامین کننده 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 (Heydariyan and Sarikhani., 2011). کود میکروبی فسفاته ممکن است به صورت پودری یا گرانوله استفاده شود که در فرایند گرانول‌سازی، بایستی پس از اختلاط اجزاء تشکیل‌دهنده جهت تهیه گرانول از تیمارهای دمایی و حرارت جهت خشک نمودن کود تولیدی استفاده شود. انجام این فرایند باعث از بین رفتن باکتریهای افزوده شده به بستر خواهد شد. بدین خاطر روشهای متنوع و ابتکاری برای گذر از این مرحله مد نظر قرار می‌گیرد. اما در نوع پودری شاید چنین مشکلی در استفاده از کود تولیدی نباشد به این خاطر در این پژوهش

ارزیابی چندین باکتری مختلف اعم از اسپوردار و بدون اسپور در دستور کار قرار گرفت، تا ضمن اندازه‌گیریهای درون شیشه‌ای (انحلال فسفات در محیط اسپربر جامد و مایع در حضور منابع مختلف فسفر)، تراکم جمعیت باکتری و ماندگاری آن بر بستر سنجیده شود و همچنین اثربخشی این کود در تامین فسفر و بهبود تغذیه فسفری و کمیت و کیفیت محصول (گیاه ذرت) بررسی شود.

کودهای میکروبی فسفاته بر بسترهای آلی و شیمیایی ارزان و در دسترس تهیه می‌شوند که در فرمولاسیون آنها به منظور افزایش اثربخشی از باکتریها و قارچهای مفید استفاده می‌نمایند. اما در این میان ماندگاری و اثربخشی باکتریهای حل‌کننده فسفات مورد استفاده در تهیه این کودها زمینه تحقیق مناسبی است و اطلاعات کمی در این مورد در دسترس می‌باشد. ضرورت دستیابی به یک گونه میکروبی کارآمد با زمان ماندگاری بالا و قابلیت جایگزینی با کودهای شیمیایی موضوع این تحقیق است و ضرورت پرداختن به آن احساس می‌شود تا با دستیابی به ترکیب مناسب باکتری و بستر شیمیایی- آلی بتوان کود میکروبی فسفاته تولید و به بازار مصرف عرضه داشت.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در گلخانه واقع در ساختمان شماره ۲ دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در منطقه کرکج انجام شد. با توجه به اینکه آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای معیاری برای اثربخشی کودهای زیستی و میکروبی هستند، آزمایش گلخانه‌ای به شرح زیر انجام گرفت. برای این منظور از یک خاک دارای کمبود فسفر (از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان) از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری شد و سپس برخی ویژگی‌های خاک مورد نظر تعیین گردید. ویژگیهای خاک مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. بعد از هوا خشک کردن خاک مورد نظر و عبور از الک دو میلی‌متری ویژگی‌های مهم خاک شامل بافت (Klute, 1986)، درصد کربن آلی (Nelson and Sommers, 1982)، فسفر قابل جذب (Olsen and Sommers, 1982) و پتاسیم قابل جذب (Thomas, 1982) اندازه‌گیری شد. خاک گلدان‌ها در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت با بخار آب استریل شده و سپس در هر گلدان به مقدار ۳ کیلوگرم استفاده شد.

**جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک**

| بافت خاک | pH | EC (dS/m) | P- available (mg/kg) | K- available (mg/kg) | $\%CaCO_3$ | %OC |
|---|---|---|---|---|---|---|
| لومی شنی | ۷/۵۶ | ۲/۹ | ۳ | ۱۹۸/۰۷ | ۲/۸۵ | ۰/۱۶۶ |

**تهیه کود میکروبی فسفاته پودری**

در این پژوهش شش باکتری موجود در بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز به نام‌های (*Pseudomonas fluorescens* Tabriz، *P. putida* Tabriz، *Pseudomnas* sp. C16-2O، *Enterobacter* sp. S16-3، *Bacillus megaterium* JK6 و *B. firmus*) مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفت. همچنین باکتری *Pantoea agglomerans* P5 به عنوان باکتری حل‌کننده فسفات (مورد استفاده در کود بارور۲) نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد تا مقایسه مطلوبی بین نمونه‌های موجود در بانک میکروبی و نمونه تجاری شده به عمل آید. به منظور تهیه کود میکروبی فسفاته پودری برای آزمایش کشت گلدانی، به شرح زیر اقدام شد. برای تهیه بستر اولیه جهت افزودن مایه تلقیح باکتریایی از بستر پایه سنگ فسفات، باگاس و گوگرد استفاده شد. این اجزاء به نسبت ۴۵: ۳۰ : ۱۵ استفاده شدند (Ziaeyan *et al.*, 2010). پس از اختلاط اجزاء و تامین رطوبت بهینه برای افزودن باکتری به آن، به صورت زیر عمل شد. پس از اختلاط اولیه ترکیب فوق، به ۹۰ گرم ترکیب اولیه ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد تا رطوبت اولیه تامین شود، سپس از کشت شبانه باکتریها تهیه شده در محیط نوترینت براث ۱ میلی‌لیتر برداشته و ۱۰ برابر در آب رقیق نموده و باکتری به بستر مرطوب افزوده شد و مخلوط شد. از کود میکروبی فسفاته پودری حاصل شده برای آزمایشات بعدی استفاده شد.

**آماده‌سازی گلدان‌ها و تلقیح گیاهان با کودهای میکروبی**

با احتساب وزن ۲ میلیون کیلوگرم خاک در هر هکتار با توجه به وزن خاک گلدان، ۶۰۰ میلی‌گرم کود سوپرفسفات تریپل، ۱۲۰۰ میلی‌گرم کود اوره و ۶۰۰ میلی‌گرم سولفات پتاسیم برای هر گلدان استفاده شد. اوره و سولفات پتاسیم به همه گلدانها افزوده شد اما کود سوپر فسفات تریپل تنها در تیمار شاهد مثبت استفاده شد. در مورد تیمارهای کودی میکروبی فسفاته نیز مقادیر معادل (۶۰۰ میلی‌گرم) و دو برابر مقدار معادل (۱۲۰۰ میلی‌گرم) کود سوپرفسفات تریپل از کودهای میکروبی فسفاته استفاده شد تا اثربخشی کودهای میکروبی مشخص شود. همچنین در دو تیمار اضافی به عنوان کنترل منفی آزمایش، مقادیر ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بستر مورد استفاده در کود

میکروبی بدون افزودن هیچ باکتری مد نظر قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در مجموع با لحاظ نمودن ۱۷ تیمار آزمایشی در ۴ تکرار که شامل تیمارهای شاهد منفی (بدون کود میکروبی و کود سوپرفسفات)، شاهد مثبت (کود سوپرفسفات تریپل بر اساس آزمون خاک)، کود فسفاته پودری (بدون افزودن باکتری)، کود میکروبی فسفاته مربوط به هر شش باکتری در مقادیر هم وزن و دو برابر مقدار کود سوپرفسفات تریپل توصیه شده بود، به انجام رسید. به منظور اعمال تیمارها ابتدا در تمام گلدانها مقادیر برابر از خاک تا ۴ سانتی‌متر از سطح گلدان افزوده شد و سپس کود سوپرفسفات و کودهای میکروبی فسفاته به مقدار مورد نیاز در گلدانها استفاده شده، سپس یک لایه خاک (۳ cm - ۲) بر روی آن قرار گرفته و بذور ذرت بر روی آن قرار گرفت. برای آماده‌سازی بذرها، ابتدا ضدعفونی بذرها با اتانول و هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ انجام گرفت و بذرهای ذرت به تعداد ۵ عدد در هر گلدان کاشته شدند و بعد از جوانه‌زنی و رشد اولیه تعداد بوته در هر گلدان به دو عدد تقلیل یافت. قبل از کاشت در همه گلدانها به مقدار برابر رطوبت خاک تامین شده و سپس کشت بذور انجام گرفت. بعد از آن با لایه‌ای از خاک سطح بذور پوشانده شد. با توجه به استفاده از اوره و سولفات پتاسیم، کل مقدار این کودها برای همه گلدانها محاسبه شده و پس از انحلال در آب به مقدار یکسان به همه گلدانها داده شد. برای تامین نیتروژن و پتاسیم مورد نیاز گیاه به ترتیب به ازاء هر گلدان ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم از اوره و سولفات پتاسیم استفاده شد. آبیاری گلدانها نیز از طریق توزین در ۰/۸FC در طول رشد گیاه که ۱۰۵ روز به طول انجامید، انجام پذیرفت. پارامترهای رشدی گیاه از جمله ارتفاع، قطر ساقه، شاخص کلروفیل، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه و میزان جذب فسفر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

## صفات اندازه‌گیری شده

### اندازه‌گیری شاخص کلروفیل برگ

غلظت کلروفیل برگ، شاخص مستقیم سلامتی گیاه و وضعیت رشد آن است. مقدار کلروفیل برگ پس از رشد کامل برگ‌ها و در پایان دوره رشد با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج اندازه‌گیری شد. در این روش کلروفیل برگ به صورت غیر تخریبی اندازه‌گیری می‌شود و به صورت شاخص کلروفیل گزارش می‌شود. این دستگاه غلظت نسبی کلروفیل برگ (شاخص کلروفیل) را در دو طول موج ۶۲۰ و ۶۴۰ نانومتر براساس مقدار نور جذب شده توسط کلروفیل بدون تخریب برگ و سریع به صورت یک عدد تعیین می‌کند که شاخصی از فعالیت فتوسنتزی برگ می‌باشد. برای این منظور پنج برگ سالم و شاداب از هر بوته (در مجموع ۲۰ برگ در هر گلدان) انتخاب شد و پهن‌ترین بخش برگ میان انبرک دستگاه قرار گرفت. سپس شاخص کلروفیل آن اندازه‌گیری شد. میانگین این قرائت‌ها در نهایت به عنوان شاخص کلروفیل برگ برای آن گلدان در نظر گرفته شد.

### اندازه‌گیری ارتفاع گیاه و قطر ساقه

قبل از برداشت گیاه، ارتفاع گیاه با خط‌کش و قطر ساقه با کولیس اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری وزن تر بخش هوایی و ریشه گیاهان

در پایان دوره رشد، اندام‌های هوایی از محل طوقه قطع گردیده و وزن تر آنها با ترازوی حساس ۰/۰۰۱ گرم تعیین شد. ریشه نیز پس از برداشت با آب معمولی شستشو داده شده و رطوبت اضافی آنها با کاغذ خشک‌کن گرفته شد و سپس با ترازو وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری وزن خشک بخش هوایی و ریشه

بخش هوایی و ریشه داخل پاکت‌های کاغذی به درون آون منتقل شده و به مدت سه روز در دمای ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد خشک شدند. سپس نمونه‌ها از آون خارج گردیده و با ترازوی حساس وزن خشک آن‌ها توزین گردید.

### هضم نمونه‌های گیاهی به روش ترسوزانی و اندازه‌گیری فسفر

نمونه‌ها بعد از خشک شدن، خرد شده و برای ایجاد نمونه‌ای یکنواخت از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شدند. برای اندازه‌گیری عنصر P، هضم نمونه‌های گیاهی به روش زیر انجام گرفت (Waling *et al*., 1989). ۰/۵گرم از نمونه‌های گیاهی توزین شده و به داخل لوله‌های هضم منتقل گردید. ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ ۶۵٪ به لوله‌ها اضافه شد. برای نمونه‌های با ماده خشک کم ۰/۱گرم نمونه گیاهی و ۳ میلی‌لیتر اسید نیتریک اضافه شد. یک نمونه به عنوان شاهد و بدون ماده خشک و فقط حاوی اسید نیتریک نیز تهیه شد. نمونه‌ها پس از چیده شدن بر روی بلوک هضم، تا یک روز بدون اعمال هیچ دمایی رها شدند. بعد از گذشت یک روز نمونه‌ها به مدت سه ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس دما به تدریج تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و به مدت شش ساعت در این دما قرار گرفت تا عمل هضم کامل شود. سپس لوله‌ها برای خنک شدن در جالوله‌ای گذاشته شدند. بعد از خنک شدن لوله‌ها، مقداری آب مقطر به محتویات درون لوله‌ها اضافه شد و صاف کردن نمونه‌ها به درون استوانه مدرج انجام گرفت. این عمل برای چندین بار متوالی تکرار شد. در نهایت حجم عصاره و

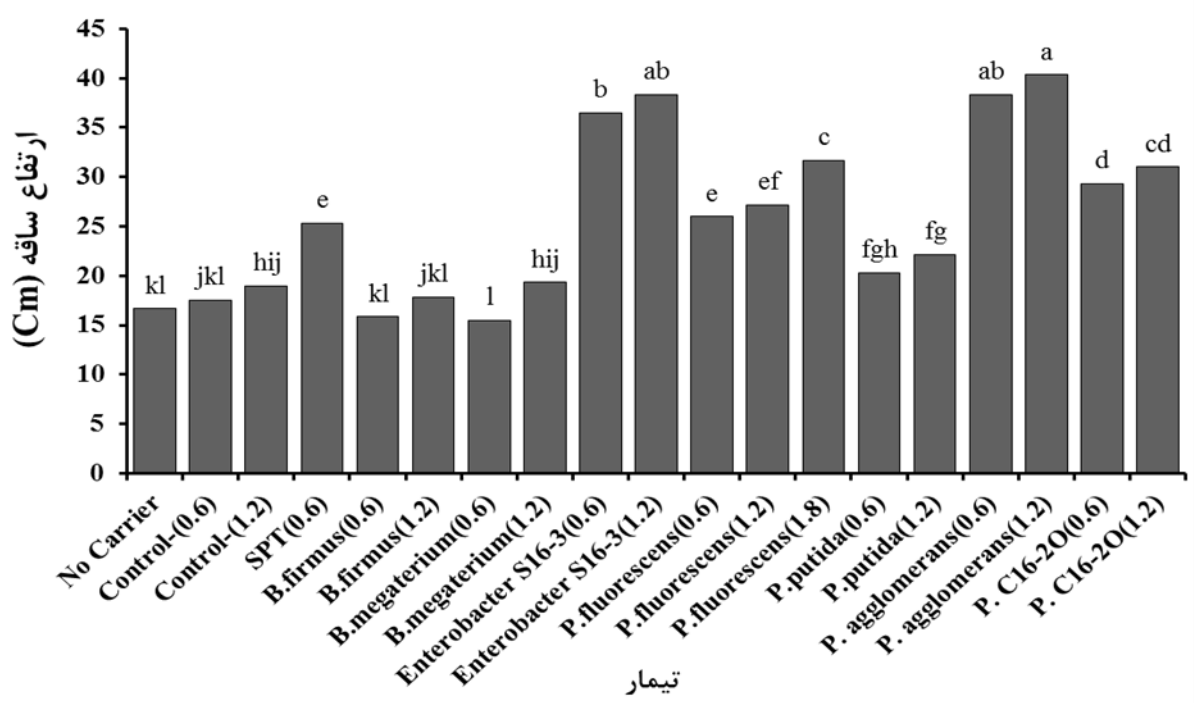
نمونه‌های بخش هوایی و ریشه به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای نمونه‌ها با مقدار ۰/۱ گرم، حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر بود.

اندازه‌گیری غلظت فسفر نمونه‌های گیاهی به روش رنگ زرد انجام شد. در مورد عصاره گیاهی دو میلی‌لیتر از عصاره گیاهی پی‌پت شده و به داخل قوطی‌های فیلم کاملاً تمیز ریخته شد. ۲ میلی لیتر از محلول معرف و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به هر یک از آنها افزوده شد. سپس کمی تکان داده شد تا خوب مخلوط شود. پس از گذشت یک ساعت با تشکیل کمپلکس زرد رنگ میزان جذب عصاره‌های تهیه شده در طول موج ۴۳۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید (Anonymous, 1980).

## نتایج و بحث

### ارتفاع ساقه

ارتفاع ساقه ذرت تحت تاثیر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد. گرچه ارتفاع ساقه تحت تاثیر مقدار کود میکروبی فسفاته بود (در مقدار ۱/۲گرم بیش از ۰/۶ گرم بود) اما شاخص فوق در تیمارهای *Pantoea agglomerans* P5 ، *Enterobacter* sp. S16-3، *P. fluorescens* و *Pseudomonas* sp. C16-2O دارای مقادیر بیشتری نسبت به شاهد کنترل مثبت (کود سوپر فسفات تریپل) بود (P<۰/۰۵). تیمارهای باکتریایی *B. firmus* و *B. megaterium* در مقدار مصرفی ۰/۶ گرم دارای ارتفاع ساقه کمتری نسبت به تیمار بدون بستر کودی (No Carrier) بودند (نمودار ۱).



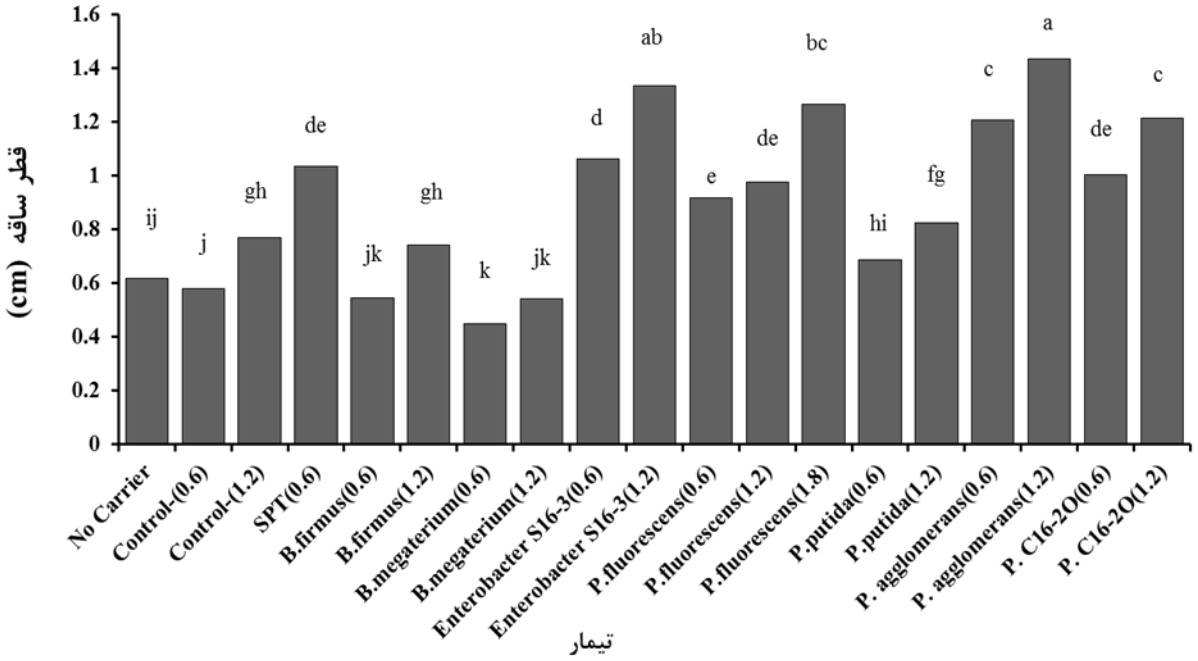

**نمودار ۱۰. اثر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته بر ارتفاع ساقه در گیاه ذرت**
**(حروف مشابه نشاندهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ستونها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند)**

افزایش ارتفاع بوته در نتیجه افزایش فسفر قابل دسترس توسط گیاه را می‌توان این چنین توجیه نمود که عنصر فسفر با اثرات مثبتی که بر افزایش توسعه سیستم ریشه‌ای دارد، میزان جذب آب و عناصر غذایی ضروری به ویژه نیتروژن را افزایش داده است که این امر موجب بهبود ارتفاع ساقه شده است (Dordas, 2009). از طرف دیگر، برخی تحقیقات نشان داده است که فسفر باعث افزایش سودمندی نیتروژن می‌شود که به تبع آن رشد و نمو بخش رویشی گیاه نیز افزایش می‌یابد (Nourmohammadi *et al*., 2001).

### قطر ساقه

قطر ساقه گیاه ذرت تحت تاثیر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. تیمار باکتریایی *P. agglomerans* P5 در مقدار مصرفی ۱/۲گرم دارای بیشترین مقدار در قطر ساقه بود (۱/۴۳ سانتی متر). و تیمارهای *Enterobacter* sp. S16-3، *P. fluorescens* و *Pseudomonas* sp. C16-2O (1.2) به ترتیب در رتبه‌های بعدی و بالاتر از تیمار کنترل مثبت (کود سوپر فسفات تریپل) قرار گرفتند. در

اندازه‌گیری این شاخص نیز همانند ارتفاع گیاه تیمارهای باکتریایی *B. firmus* و *B. megaterium* در مقدار مصرفی ۰/۶ گرم دارای قطر ساقه کمتری نسبت به تیمار بدون بستر کودی (No Carrier) بودند. در اینجا نیز سطح مصرفی ۱/۲گرم کود میکروبی فسفاته دارای عملکرد بیشتری نسبت به ۰/۶گرم به ازای هر گلدان بود. این موضوع در سطح مصرفی ۱/۸گرم که تنها برای باکتری *P. fluorescens* بکار رفت نیز مشاهده گردید که نسبت به دو سطح دیگر تفاوت معنی‌داری نشان داد (نمودار ۲).

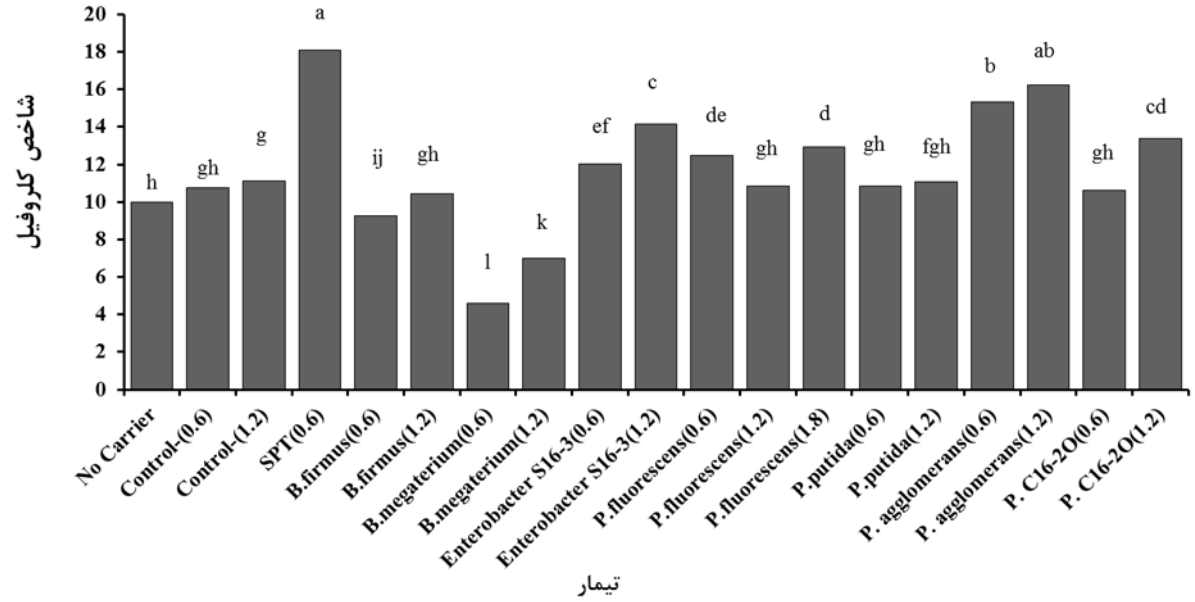



**نمودار ۲. اثر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته بر قطر ساقه در گیاه ذرت (**
**حروف مشابه نشاندهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ستونها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند)**

**شاخص کلروفیل**

در بخش مواد و روش‌ها در مورد شاخص کلروفیل و نحوه اندازه‌گیری آن اشاره شد. این شاخص تحت تاثیر تلقیح کودهای میکروبی در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. مطابق نمودار ۳ شاخص کلروفیل برای تیمار کنترل مثبت (سوپرفسفات تریپل) و تیمار باکتریایی P5 *P. agglomerans* با میانگین ۱۸ و ۱۶/۲۵ بالاترین مقدار شد که از لحاظ آماری درصد تاثیرگذاری آنها بر شاخص کلروفیل در یک سطح بود. علاوه بر این کود باکتریایی *Enterobacter* sp. S16-3 در سطح مصرفی ۱/۲ (گرم به ازای گلدان) با میانگین ۱۴/۱۴ بعد از این دو تیمار قرار گرفت. تیمارهای باکتریایی *B. firmus* و *B. megaterium* از لحاظ آماری با شاخص کلروفیل کمتری از تیمار بدون بستر کودی (No Carrier) قرار گرفتند (نمودار ۳).

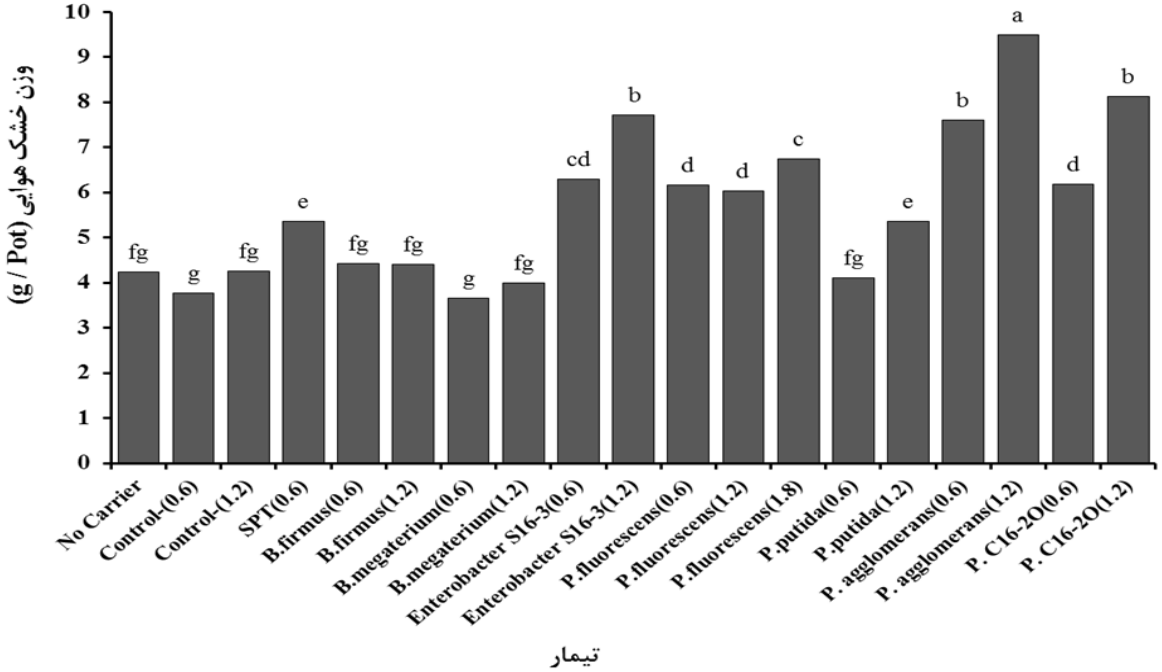
شاخص کلروفیل برای گیاه ذرت در حضور دو تیمار زیستی P5 و شیمیایی SPT (سوپرفسفات تریپل) بالاترین مقدار بود که موجب افزایش شاخص کلروفیل گیاه به میزان ۵۱/۲۸٪ نسبت به شاهد (No Carrier) با شاخص کلروفیل ۹/۹۸ شد. به دلیل فعالیت حل‌کنندگان فسفات موجود در کودهای زیستی، غلظت نیتروژن (جز ساختار اصلی کلروفیل) بخش هوایی گیاه ذرت افزایش یافت. تیمار باکتریایی P5 جزو حل‌کننده فسفات بوده که با افزایش فراهمی فسفر (از طریق تولید اسیدهای آلی و کاهش pH)، میزان جذب نیتروژن را نیز به واسطه اثرات سینرژیستی و هم‌افزایی افزایش داده است. به نظر می‌رسد تیمار باکتریایی P5 از طریق سازوکارهای مختلفی از جمله تولید سیدروفورها، سنتز آنتی بیوتیک‌ها، تولید هورمون‌های گیاهی، افزایش جذب فسفرتوسط گیاه، کمک به جذب نیتروژن و سنتز آنزیم‌هایی که مقدار اتیلن در گیاه را تنظیم می‌نماید به توسعه و رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند (Abdul-Jaleel *et al*., 2007).




**نمودار ۳۰. اثر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته بر شاخص کلروفیل در گیاه ذرت**
**(حروف مشابه نشاندهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ستونها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند)**

**وزن خشک هوایی**

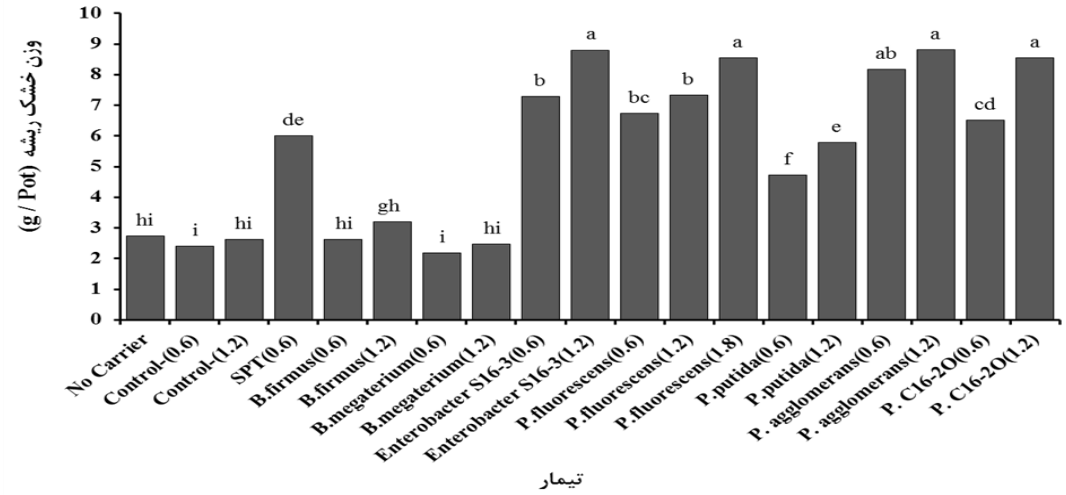
وزن خشک هوایی گیاه ذرت تحت تاثیر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. مطابق نمودار ۴ وزن خشک هوایی برای تیمار *Pantoea agglomerans* P5 (1.2)، *Pseudomonas* sp. C162-O (1.2)، *Enterobacter* sp. S16-3 (1.2)، *Pantoea agglomerans* P5 (0.6)، *P. fluorescens* (1.8)، *Enterobacter* sp. S16-3 (0.6) و *Pseudomonas* sp. C162-O (0.6) به ترتیب با میانگین ۹/۵، ۸/۱۳، ۷/۷۳، ۷/۶ و ۶/۷۵ گرم بالاترین مقدار بود که موجب افزایش وزن خشک هوایی گیاه ذرت نسبت به شاهد کنترل مثبت (کود سوپرفسفات تریپل) شدند. تیمارهای(0.6) *P. putid*، (0.6) *B. megaterium* (1.2) & و شاهد کنترل منفی (0.6) به ترتیب وزن خشک هوایی کمتری نسبت به تیمار بدون بستر داشتند.




**نمودار ۴. اثر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته بر وزن خشک هوایی در گیاه ذرت**
**(حروف مشابه نشاندهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ستونها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند)**

**وزن خشک ریشه**

وزن خشک ریشه در گیاه ذرت تحت تاثیر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. مطابق نمودار ۵ وزن خشک ریشه برای تیمار *Pantoea agglomerans* P5 (1.2)، *Enterobacter* sp. S16-3 (1.2)، *P. fluorescens* (1.8)، *Pseudomonas* sp. C162-O (1.2) و *Pantoea agglomerans* P5 (0.6) به ترتیب با مقادیر میانگین ۸/۸۲ و ۸/۰۸ ، ۸/۵۵ ، ۸/۵۴ و ۸/۱۷ گرم بیشترین مقدار بود و همگی آنها در یک گروه آماری قرار گرفتند. تیمار شاهد کنترل منفی یا بدون بستر میکروبی (1.2)، *B. firmus* (0.6)، *B. megaterium* (1.2) و شاهد کنترل منفی (0.6) نیز با میانگین وزن خشک ۲/۶۳، ۲/۶۲، ۲/۴۶ و ۲/۴۰ گرم در یک سطح آماری قرار گرفتند و هیچ اختلاف آماری معنی‌داری با تیمار بستر خالی ( No Carrier) نداشتند.




**نمودار ۵. اثر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته بر وزن خشک ریشه در گیاه ذرت**
**(حروف مشابه نشاندهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ستونها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند)**

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که کودهای میکروبی فسفاته می‌توانند تاثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه گیاه ذرت داشته باشند. همچنان که در برخی موارد چنین گزارشاتی در مورد گیاهان دیگر شده است. در یک آزمایش گلخانه‌ای (کشت خیار و فلفل) با استفاده از خاک استریل و فقیر از نظر پتاسیم و فسفر قابل دسترس برای گیاه، تلقیح همزمان سویه‌های رهاکننده فسفر و پتاسیم موجب افزایش وزن خشک ریشه و بخش هوایی در این تیمارها نسبت به شاهد شد. در حالی که در تیمار سنگ فسفات و پتاسیم هیچ گونه تاثیر معنی‌داری در افزایش وزن خشک ریشه و بخش هوایی نسبت به شاهد حاصل نشد (Han, 2005). نتایجی که از تلقیح باکتری‌های محرک رشد با گیاه گندم بر روی وزن تر و خشک ریشه گزارش شده است ضد و نقیض است. گزارش شده است که تلقیح گیاه گندم با سویه‌های *Azotobacter chroococcum* بر وزن خشک ریشه معنی‌دار نبود، اگرچه همه تیمارهای باکتریایی نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش وزن خشک ریشه شده‌اند (Rajai *et al*., 2007). گزارش شده است که تلقیح با باکتری‌های محرک رشد بیش از ۲۵٪ باعث افزایش وزن خشک ریشه ماش شد (Ashfaq *et al*., 2011). طی آزمایشی گزارش شد که اثر سویه‌های مختلف *سودوموناس*، *آگروباکتریوم* و *آزوسپیریلوم* منجربه افزایش ۵۲-۱۱ درصدی در وزن خشک ریشه کلزا شد (Bertrand *et al*., 2001). در تحقیقی گزارش شد که وزن خشک ریشه کلزا پس از تلقیح با *سودوموناس پوتیدا* دارای توان تولید IAA ۲۵/۵ درصد افزایش یافت (Belimov *et al*., 2001).

**جذب فسفر در بخش هوایی**

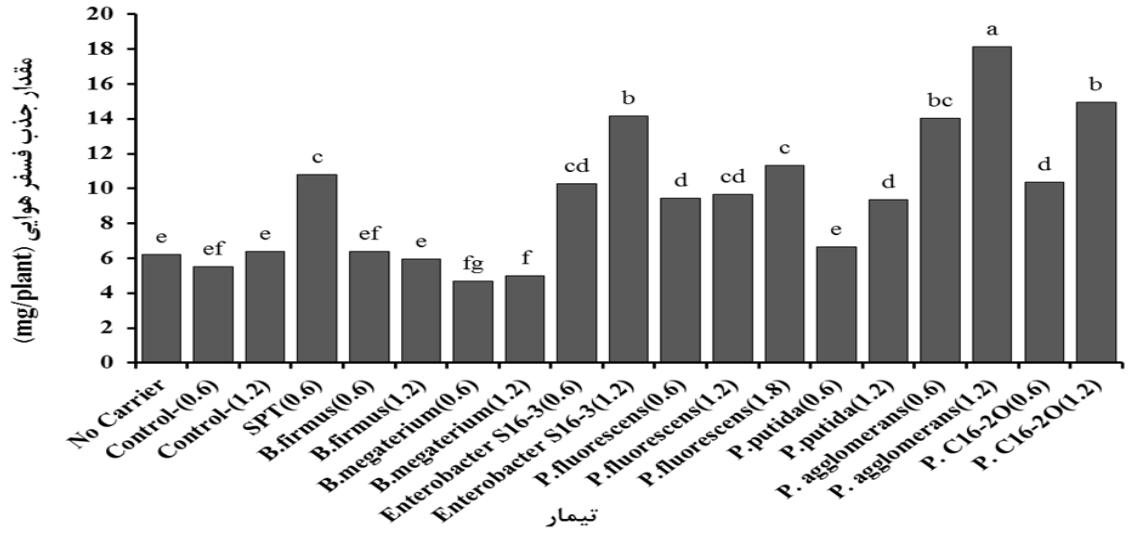
میزان جذب فسفر هوایی تحت تاثیر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. تیمار کود میکروبی *Pantoea agglomerans* P5 (1.2) دارای بیشترین مقدار جذب فسفر با میانگین ۱۸/۱۱ mg/plant بود. با وجود اینکه غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه در تیمار کود شیمیایی سوپرفسفات (شاهد کنترل مثبت) بالاتر از همه تیمارهای اعمال شده بود ولی تیمارهای میکروبی *Pantoea agglomerans* P5، *Pseudomonas* sp. C162-O، *Enterobacter* sp. S16-3، *Pantoea agglomerans* P5 در مقدار ۱/۲گرم و *P. fluorescens* در مقدار ۱/۸ گرم دارای مقادیر بالاتری از نظر

مقدار جذب فسفر بودند. به این لحاظ دارای اختلاف آماری معنی‌دار با تیمار شیمیایی سوپرفسفات بود اما تیمارهای بستر بدون باکتری، *B. megaterium* و *B. firmus* نه تنها هیچ برتری نسبت به تیمار شاهد بدون بستر (No Carrier) نداشتند بلکه در سطوح پایین‌تری از آن هم قرار گرفتند (نمودار ۶).

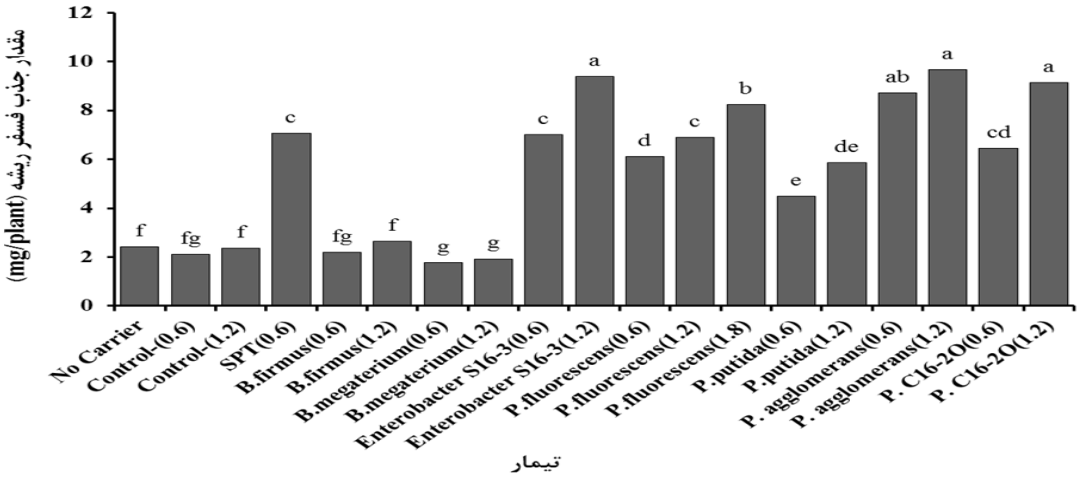
نتایجی که از تاثیرگذاری حل‌کننده‌های فسفاته بر محتوای فسفر بخش هوایی در گیاه مریم‌گلی به دست آمد، حاکی از آن است که افزایش میزان جذب فسفر توسط ریشه گیاهان تیمار شده با کودهای بیولوژیکی فسفاته به علت افزایش قابلیت دسترسی به فسفر و متعاقب آن بهبود ظرفیت ریشه برای جذب فسفر و انتقال آن به بخش هوایی گیاه می‌باشد (Hashem Abadi *et al*., 2012).

**جذب فسفر در ریشه**

میزان جذب فسفر ریشه تحت تاثیر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. تیمار کود *Pantoea agglomerans* P5 (1.2) دارای بیشترین مقدار جذب فسفر با میانگین ۹/۶۸۲ mg/plant توسط ریشه بوده و موجب افزایش میزان جذب فسفر به میزان ۲۷/۱٪ نسبت به شاهد مثبت (SPT) و ۷۲/۰۶٪ نسبت به شاهد منفی (No Carrier) شد و از این لحاظ دارای اختلاف آماری معنی‌دار با تیمار شیمیایی سوپرفسفات بود. اما تیمارهای کنترل منفی، *B. megaterium* و *B. firmus* تقریبا با تیمار شاهد بدون بستر (No Carrier) در یک سطح قرار گرفته و هیچ برتری نسبت به هم نداشتند (نمودار ۷).




**نمودار ۶. اثر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته بر جذب فسفر هوایی در گیاه ذرت**
**(حروف مشابه نشاندهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ستونها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند)**




**نمودار ۷. اثر تلقیح کودهای میکروبی فسفاته بر جذب فسفر ریشه در گیاه ذرت (حروف مشابه نشاندهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ستونها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند)**

**نتیجه‌گیری**

در جمع‌بندی نتایج آزمایش کودهای میکروبی بر پارامترهای اندازه‌گیری شده گیاه ذرت می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که کاربرد کودهای میکروبی تاثیرات افزایشی معنی‌داری بر پارامترهای اندازه‌گیری شده داشته است. نتایج به دست آمده نشان داد که کاربرد کودهای میکروبی فسفاته در گیاه ذرت رقم سینگل‌کراس ۷۰۴، بر وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی، شاخص کلروفیل، مقدار و جذب فسفر بخش ریشه و بخش هوایی، تاثیر کاملاً معنی‌داری دارد. تلقیح کودهای میکروبی حاوی باکتریهای محرک رشد گیاه کلنیزاسیون این باکتریها را در ریزوسفر گیاه به دنبال داشته است و شاهد اثرات افزایشی پارامترهای اندازه‌گیری شده بودیم. تیمارهای کودی *Enterobacter* sp. S16-3 و *Pseudomonas* sp. C162-O در اکثر پارامترهای اندازه‌گیری شده دارای عملکردی شبیه تیمار *Pantoea agglomerans* P5 بودند و هر سه این تیمارها در اکثر موارد دارای عملکرد بالاتری نسبت به تیمار کود شیمیایی سوپرفسفات تریپل بودند (بجز در مورد اندازه گیری عنصر فسفر)، تیمارهای *P.fluorescens* و *P.putida* هم تا حدودی دارای عملکرد مشابه یکدیگر بودند. گرچه تیمار کود شیمیایی (سوپرفسفات تریپل) نسبت به شاهد عملکرد خوبی داشته است ولی اینکه تیمار باکتریایی در برخی از باکتریها از جمله تیمار *Pantoea agglomerans* P5، *Enterobacter* sp. S16-3، *P. fluorescens* و *Pseudomonas* sp. C162-O شرایط بهتری را برای گیاهان تلقیح شده به وجود آوردند را باید در اثر یک بعدی کودهای شیمیایی در مقایسه با کودهای میکروبی و اثرات چند بعدی آنها جستجو نمود. کود شیمیایی فسفاته فقط در جهت برآورد نیاز فسفری گیاه بوده است ولی تیمارهای باکتریایی عملکرد چندگانه علاوه برتامین نیاز فسفری داشته‌اند که از جمله آن میتوان به سایر ویژگی‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه مثل تولید هورمونهای محرک رشد اشاره کرد. در مطالعات مختلف به نقش هورمون اکسین در ریشه‌زایی اشاره شده است و تولید این هورمونها یکی از ویژگی‌های PGPR باکتریهای بکار رفته در کودهای میکروبی می‌تواند باشد (Ahmad *et al*., 2005). لازم به ذکر است که در نتایج گلدانی اثر سطوح مختلف مصرف کودی کاملاً معنی‌دار بود و در اکثر موارد سطح مصرفی ۱/۲ گرم نسبت به سطح مصرفی ۰/۶گرم دارای عملکرد بیش از دو برابر در گیاه بود. با توجه به یافته‌های این تحقیق استفاده از باکتریهای *Enterobacter* sp. S16-3 و *Pseudomonas* sp. C162-O که هنوز به مرحله تجاری‌سازی نرسیده‌اند می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

## REFERENCES


Abdul-Jaleel, C., P. Manivannan, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Gopi, R. Panneerselvam. (2007) Pseudomonas fluoresense enhances biomass yield and ajmalicine production in Catharanthus roseus under water deficit stress. Colloids and Surface B: *Biointerfaces*. 60: 7-11

Ahmad, F., Ahmad, I. and Saghir Khan, M. (2005) Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, 29(1): 29-34

Anonymous. 1980. Soil and Plant Testing, as a basis of fertilizer recommendation. FAO soils bulletin. 38/2: 90-100.

Ashfaq Anjum, M., Zahir, Z.A., Ashraf, M. and Arshad, M., (2011) Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (Vigna radiata L.) seedlings under axenic conditions. *Soil Environ*, 30(1): 18-26.

Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergiyeva, T.A., Engorova, T.V. and Metiyeva, A.A. (2001) Characterization of PGPR isolated from polluted soils and 1-aminocyclopropane-1- carboxylate ACC deaminase. Can. J. Microbiol, 47:462-465

Bertrand, H., Naline, R., Bally, R. and Cleyet-marel, J.C. (2001) Isolation and indentfication of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (Brassica napus). *Biology and Fertility of Soils*, 33(2): 152-156

Chen, Y.P. Rekha, P.D. Arun, A.B. Shen, F.T. Lai, W.A. Young, C.C. (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol.* 34: 33–41

Dai, J., Becquer, T., Rouiller, J., Reversat, H., Bemhard, G. and Lavelle F. (2004) Influence of heavy metals on C and N mineralization and microbial biomass in Zn-, Cu- and Cd-contaminated soils. *Applied Soils Ecology*,25:99-109

Davarinejad, G., Haghnia, G., and Lakzian, A. (2004) Effect of animal fertilizers and enriched compost on wheat yield. *Agriculture Technology and Science Journal.* 18: 101-108. (In Farsi with English Summary)

Dordas, C. (2009) Dry matter, nitrogen and phosphorus accumulation: partitioning and remobilization as affected by N and P fertilization and source-sink relation. *European Journal of Agronomy*, 30: 129-139

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

141-150. (In Farsi)

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

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

Han, H.S., Lee, K.D. (2005) Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 1: 210–215

Hashem Abadi, D., Zaredost, F., Barari Ziyabari, M., Zarchini, M., Kaviani, B., Jadid Solimandarabi, M., Torkashvand, A.M. and Zarchini, S. (2012) Influence of phosphot biofertilizer on quantity and quality features of marigold. *Australian Journal of Crop Science*. 6(6): 1101-1109

Heydariyan, Z., Sarikhani, M. R. (2011) The growth promoting bacteria (PGPR) Promising approach for sustainable agriculture. The first Conference of strategies to achieve sustainable agriculture. June 5-6, Ahvaz, Iran.

Izquierdo, I., Caravaca, F., Alguacil, M.M., Hernandze, G., Rolan, A. (2005) Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoraionafter revegtation of a mining area under subtropical conditions. *Appl Soil Ecol* 30: 3-10

Kacar, B. and Katkat,V. (2010) Bitki besleme,4.Baski.Nobel Yaymevi,Ankara.pp. 217-289

Kader, M.A., Mian, M.H. and Hoque, M.S. (2002) Effect of Azotobacter inoculants on the yield and nitrogen uptake by wheat. *J. Biological Sci,* 4: 259-261

Khan, M.S., Zaidi, A. and Wain, P.A. (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisims in sutainable agriculture –A review.Agron.Sustain. Dev.27:29-43

Kiani-rad, M. (1995) Evaluation of phosphate solubilizing microorganisms and their effects on the reduction of phosphate fertilizers in the cultivation of soy. Master thesis. Tehran University. Karaj. Iran. (In Farsi)

Klute, A. (1986) Methods of soil analysis. Part I: physical and mineralogical methods. ASA,Inc.SSSA Inc.Madison,Wisconsin USA.

Liu, R.J., Chen, Y.L. (2007) Mycorrhizology (in Chinese). Science Press (www.sciencep.com), Beijing. ISBN 978-7-03-017290-7. p 447

Malakoti, M.J. (1995) sustainable agriculture and increase performance by optimizing the use of fertilizers in Iran. dissemination of agricultural education. Karaj. Iran. (In Farsi)

Malboobi, M. A., Behbahani, M., Madani, H., Owlia, P., Deljou, A., Yakhchali, B., Moradi, M. and Hassanabadi, H. (2009) Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 25:1479-1484

Nelson, D.W., Sommers, L.E., Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, P.R. (1982) Total carbon, organic carbon and organic matter, Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and mic-obiological properties. *Soil Science Society of America*, 539-580.

NourMohammadi, G., Siadat, S.A. and Kashani, A. (2001) Cereal Agronomy. Publicatio of ShahidChamran, Ahwaz, Ahwaz, Iran. p. 183-187. (In Farsi)

Olsen, S.R. and Sommers, L.E.. (1982) Phosphorus. p. 403-430. In: A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI

Rai, S.N. and Gaur, A.C. (1988) Characterization of Azotobacter spp. Effect of Azotobacter and Azospirillum as inoculant on the yield and N-uptake of wheat crop. *Plant and Soil* 34: 131-134

Rajai, S., Alikhani, H. and Raeesi, F. (2007) Effect of native strains A. *chroococcum* potentials on growth, yield and nutrient uptake in wheat, *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 11(41): 285-296

Safari,M. (2014) the tendency of conventional agriculture (Intensive Agric.) Sustainable agriculture (Sustaniable Agric) solutions to improve the quality of soils in semi-arid regions of Iran. the first national conference on sustainable management of soil resources and the environment. Kerman. martyr Bahonar University. (In Farsi)

Thomas, G.W. (1982) Exchangeable Cations. p. 159-165. In: A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.

Turk, M.A., Assaf, T.A., Hameed, K.M. and Al-Tawaha, A.M. (2006) Significance of Mycorrhiza. *World J. Agric. Sci.*, 2(1): 16-20

Waling, I., Vark, W.V., Houba, V.J.G. and Vanderlee, J.J. (1989) Soil and Plant Analysis, a series of syllabi. Part 7. Plant Analysis Procedures. Wageningen Agriculture University, The Netherland.

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. (In Farsi)