

بررسی اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر توزیع شکل‌های فسفر در یک خاک آهکی

ندا مرادی^{۱*}، میرحسین رسولی صدقیانی^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۵)

چکیده

شناخت توزیع شکل‌های مختلف فسفر تحت تأثیر ریزجانداران در گستره وسیعی از خاک‌ها، برای درک بهتر از ظرفیت آن‌ها در حفظ و تأمین فسفر برای گیاهان ضروری است. برای بررسی نقش باکتری‌های حل‌کننده فسفات در توزیع شکل‌های فسفر خاک، یک نمونه خاک زراعی سطحی (صفر تا ۳۰ سانتی‌متر) با بافت لوم، متعلق به زیرگروه Typic clacixerpts در استان آذربایجان غربی انتخاب شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل مایه‌زنی باکتری در دو سطح (با و بدون سویه‌های سودوموناس (*Pseudomonas fluorescens*) و باسیلوس (*Bacillus megaterium*)) و زمان نمونه-برداری (صفر، ۷، ۲۱ و ۴۵ روز) در شش تکرار اجرا شد. نمونه‌های خاک به مدت ۴۵ روز در انکوباتور در دمای ثابت ۲۸ درجه سلیسیوس قرار داده شدند و سپس شکل‌های مختلف فسفر معدنی، فسفر آلی و فسفر قابل‌استفاده (Olsen-P) به روش عصاره‌گیری دنباله‌ای تعیین شدند. مقدار pH خاک ۷/۷، مقدار رس خاک مورد آزمایش ۱۷ درصد و کربنات کلسیم فعال در خاک ۴/۳ درصد بود. شکل آپاتیت ($Ca_{10}-P$)، ۴۵ درصد فسفر کل خاک را تشکیل داد و نشان دهنده اهمیت آن در خاک-های آهکی است. نتایج نشان داد که تیمار باکتری باعث تغییرات معنی‌داری در میزان فسفر قابل‌استفاده، فسفر آلی و فسفر معدنی شدند. فسفر قابل‌استفاده و فسفر آلی و شکل معدنی دی‌کلسیم فسفات (Ca_2-P) در تیمار باکتری در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب ۶۶، ۱۵ و ۹۲ درصد افزایش نشان دادند. اما شکل‌های اکتاکلسیم فسفات (Ca_8-P) و ($Ca_{10}-P$) در تیمار باکتری به ترتیب با ۱۳ و پنج درصد کاهش همراه بودند. مقدار شکل‌های مختلف فسفر در تیمار باکتری، به صورت $O-P > Ca_{10}-P > Ca_8-P > Ca_2-P > Al-P$ شکل آلی بود. هم‌چنین شکل آلومینیوم فسفات ($Al-P$) در تیمار باکتری در مقایسه با شاهد، ۱۰ درصد افزایش نشان داد. در تیمار باکتری همبستگی معنی‌داری ($r = 0.84^{***}$) بین فسفر (Olsen-P) و (Ca_2-P)، ($Al-P$) و ($O-P$) در خاک وجود داشت. به‌طور کلی نتایج نشان داد که تلقیح باکتری‌ها سبب افزایش حلالیت شکل‌های قابل‌استفاده فسفر در خاک شد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، سودوموناس، فسفر قابل‌استفاده، عصاره‌گیری متوالی

مرادی ن.، رسولی صدقیانی م.ح. ۱۳۹۸. بررسی اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر توزیع شکل‌های فسفر در یک خاک آهکی. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۷ شماره ۲. ص: ۶۷-۸۱.

۱-استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهیدچمران اهواز (مکاتبه‌کننده)

۲-استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

* پست الکترونیک: n.moradi@scu.ac.ir

مقدمه

فسفر (P) یک عنصر غذایی ضروری گیاه بوده و نقش کلیدی در رشد و توسعه گیاه دارد (Zhang *et al.*, 2014). فسفر در گیاهان بعد از نیتروژن دومین عنصر غذایی ضروری بوده که برای فرآیندهای بیوشیمیایی مختلف و تکمیل رشد زایشی گیاه مورد نیاز است (Mehra *et al.*, 2015). خاک به‌طور متوسط حاوی ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم فسفر کل بوده که از این مقدار تنها یک تا ۲/۵ درصد آن قابل استفاده برای جذب توسط گیاهان می‌باشد (Chen *et al.*, 2008). فسفر در خاک در هر دو شکل معدنی و آلی وجود دارد. با اینکه فسفر به مقدار قابل توجهی در خاک وجود دارد، ولی از آنجایی که قسمت عمده آن در خاک به واسطه اکسیدهای فلزی و نرخ پایین انتشار آن تثبیت می‌شود، این عنصر جزء عناصر با دسترسی خیلی پایین برای گیاهان محسوب می‌شود (Mehra *et al.*, 2015). بنابراین قسمت عمده فسفر کل موجود در خاک به شکل ترکیبات آلی تثبیت می‌شود (Kong *et al.*, 2014) که تنها ۳۰ درصد از آن برای ریشه-های گیاهان قابل استفاده است. گیاهان قادر به جذب فسفر آلی نمی‌باشند، مگر اینکه هیدرولیز شده و به شکل فسفر معدنی در بیاید. فسفر معدنی در خاک ممکن است از طریق تثبیت یا جذب در رس، غیرقابل استفاده باشد (Halajnia *et al.*, 2009). فسفر معدنی در خاک‌های اسیدی به دلیل تثبیت توسط اکسیدهای آهن و آلومینیم و در خاک‌های آهکی به دلیل تثبیت توسط ترکیبات کلسیم یکی از عوامل محدود کننده رشد گیاه است (Yadav *et al.*, 2017). در نتیجه غلظت فسفر معدنی در محلول خاک به ندرت بیش از ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم است. معمولاً به دلیل آهکی بودن اکثر خاک‌های ایران غلظت قابل جذب این عنصر کم‌تر از حد بحرانی بوده و سالانه مقدار زیادی کود فسفره برای تأمین فسفر مورد نیاز گیاهان زراعی به زمین‌های زیر کشت افزوده می‌شوند (Golmohammad *et al.*, 2016). با توجه به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مناطق مختلف، فسفر می‌تواند به‌صورت ترکیب شیمیایی متنوعی در خاک مشاهده شود، گیاهان تنها قادر به استفاده از بخش محدودی از فسفر کل خاک می‌باشند. با تعیین مقادیر و توزیع اجزای فسفر در خاک می‌توان روش مدیریتی مناسب برای افزایش قابلیت استفاده فسفر توسط گیاهان را پیشنهاد

نمود. آگاهی از شکل‌های شیمیایی فسفر در فهم شیمی فسفر در خاک و درک جنبه‌های حاصلخیزی خاک نقش مؤثری دارد و می‌توان با استفاده از اطلاعات به‌دست آمده برای افزایش قابلیت جذب فسفر توسط گیاهان روش مدیریتی مناسبی پیشنهاد کرد. با توجه به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها، فسفر می‌تواند به صورت ترکیبات شیمیایی متنوع مانند فسفات‌های کلسیم، آهن و آلومینوم در خاک حضور داشته باشد (Dehghan *et al.*, 2008). برای شناسایی شکل‌های مختلف فسفر پژوهش‌های زیادی انجام شده است، تا بدین وسیله ارتباط میان جذب فسفر به وسیله گیاه با فسفر خاک مشخص شود. با توجه به حلالیت متفاوت شکل‌های مختلف فسفر، تعیین فراوانی و توزیع آن‌ها امکان شناخت بیش‌تر از قابلیت‌های گیاهان در استفاده از فسفر خاک بیش‌تر را فراهم خواهد کرد. یکی از روش‌های متداول که تاکنون برای تفکیک اجزای فسفر معدنی و آلی خاک مورد استفاده قرار گرفته، استفاده از عصاره‌گیرهای مختلف برای جداسازی بخش‌های مختلف فسفر خاک است، که اولین بار توسط دین (Dean, 1949) انجام شد. سپس توسط چانگ و جکسون (Chang & Jakson, 1957) تغییراتی در آن صورت گرفت و در سال‌های بعد تصحیح و تکمیل شد. اساس تمامی این روش‌ها بر حلالیت و رسوب اجزای مختلف فسفر در مواد شیمیایی متفاوت و pHهای مختلف استوار است.

جامعه میکروبی خاک، حاصلخیزی آن را از طریق تجزیه، معدنی‌کردن، ذخیره‌سازی و رهاسازی عناصر غذایی تحت تأثیر قرار می‌دهند. باکتری‌ها حل‌کننده فسفات از طریق معدنی‌کردن فسفر آلی و انحلال فسفات‌های رسوب‌یافته، فراهم‌سازی فسفر برای گیاهان را افزایش می‌دهند (Pradhan & Sukla, 2005). کاهش pH، تولید اسیدهای آلی و فسفات‌ها از سازوکارهای اصلی باکتری‌های حل‌کننده فسفر است (Khan *et al.*, 2009). باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها در انحلال فسفات بسیار موثرترند و جمعیت بالایی را به خود اختصاص می‌دهند (Alam *et al.*, 2002). فلاح (Fallah, 2006) جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات را ۸۸ درصد جامعه میکروبی در خاک‌های شمال ایران گزارش کرد. گزارش‌های متفاوتی توانایی گونه‌های مختلف باکتری در انحلال فسفات معدنی نامحلول از قبیل تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات،

از ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای استفاده از شکل-های غیرقابل جذب فسفر و تبدیل آن به شکل‌های قابل جذب برای گیاه و رفع آلودگی محیط زیست می‌تواند مفید باشد. لذا اطلاع از وضعیت فسفر و شکل‌های آن در خاک‌های آهکی ایران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و ریزجانداران حل‌کننده فسفات، می‌تواند در این امر مؤثر باشد. بنابراین با توجه به این موضوع که باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توانند بر قابلیت دسترسی فسفر توسط گیاه مؤثر باشند، این تحقیق برای ارزیابی نقش باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر مقادیر قابل استفاده فسفر و شکل‌های شیمیایی مختلف آن در خاک‌های آهکی استان آذربایجان غربی انجام شد.

مواد و روش‌ها

خاک‌های مورد مطالعه و تعیین ویژگی‌های فیزیکی و

شیمیایی خاک‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۵ نمونه مرکب خاک سطحی (صفر تا ۳۰ سانتی‌متری) از خاک‌های زراعی (تحت زراعت چغندرقد) شهرستان ارومیه متعلق به رده Inceptisols در استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های خاک پس از هوا خشک شدن، از غربال دو میلی‌متری عبور داده شدند. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نظیر بافت به روش هیدرومتری (Gee & Bauder, 1986) ، pH در سوسپانسیون ۱:۵ خاک و محلول ۰/۰۱ مولار کلرید کلسیم، کربن آلی به روش والکی و بلک و (Walky & Black, 1934)، کربنات کلسیم معادل (CCE) به روش خنثی‌سازی با اسید کلریدریک (Rayment & Higginson, 1992)، ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) به روش استات سدیم نرمال (Page et al., 1982) و کربنات کلسیم فعال به روش اگزالات آمونیوم (Drouineau, 1942) اندازه‌گیری شدند. شکل‌های مختلف فسفر شامل فسفر کل خاک (TP) (walker & adam, 1958)، فسفر آلی (O-P) و معدنی (MP) خاک، فسفر قابل استفاده گیاه (Olsen-P) به روش اولسن (Olsen et al., 1954) و عصاره‌گیری متوالی شکل‌های معدنی فسفر شامل دی‌کلسیم فسفات (Ca₂-P)، اکتاکلسیم فسفات (Ca₈-P)، فسفات آلومینیم (Al-P)، فسفات آهن (Fe-P) و آپاتیت (Ca₁₀-P) به روش جینگ و گو (Jiang & Gu, 1989) انجام شد. سپس فسفر

هیدروکسی آپاتیت و سنگ فسفات را عنوان کردند. استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌طور همزمان جوانه‌زنی، جذب فسفر توسط گیاه و عملکرد گیاه زراعی را افزایش می‌دهد.

بسیاری از مطالعات استفاده از ریزجانداران حل‌کننده ترکیبات فسفات را به عنوان یک راهکار جایگزین برای کودهای فسفاته گزارش کرده‌اند (Sudisha et al., 2018; Abdelrahman et al., 2016). از سوی دیگر اخیراً استفاده از ریزموجودها به‌عنوان کودهای زیستی به‌دلیل تأثیرات مثبت آن‌ها بر رشد و عملکرد گیاه و حاصلخیزی خاک، مورد توجه قرار گرفته‌اند. کودهای زیستی هم‌چنین دوستدار محیط زیست و مقرون به صرفه هستند. باکتری-های حل‌کننده فسفات با ترشح اسیدهای آلی سبب حل شدن فسفر غیرقابل استفاده به شکل‌های قابل استفاده گیاه مانند $H_2PO_4^-$ و HPO_4^{2-} می‌شوند (Richardson & Simpson, 2011). میزان فراهم‌سازی فسفات توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات از منابع معدنی و آلی فسفات به‌ترتیب در محدود ۲۵ الی ۴۲ و هشت الی ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بوده است (Tao et al., 2008). قادری (Gaderi et al., 2008) در بررسی اثر حل‌کنندگی و رهاسازی فسفات در سه باکتری *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. fluorescens* مقادیر آزاد شده فسفر را از هیدروکسید آهن (III) به‌ترتیب ۵۱، ۶۲ و ۲۹ درصد گزارش دادند و بیش‌ترین مقدار فسفر آزاد شده ۱۴/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. *P. fluorescens* از منابع تری‌کلسیم فسفات، فسفات آلومینیم و فسفات آهن به‌ترتیب مقادیر ۱۰۰، ۹۲ و ۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر آزاد ساخت (Khan et al., 2009). اطلاعات نشان می‌دهد که گونه‌های باسیلوس، سودوموناس و ریزوبیوم قویترین حل‌کنندگان فسفات بوده و تری‌کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با سنگ فسفات تجزیه‌پذیرتر می‌باشند. استفاده از باکتری باسیلوس در حدود ۲۰ درصد کم‌تر فسفر قابل استفاده را به شکل غیرقابل استفاده تبدیل کرده است (Turan et al., 2007).

در دهه‌های گذشته در خاک‌های ایران برای افزایش قابلیت استفاده فسفر خاک، مقادیر زیادی کود فسفاتی مصرف شده که این امر می‌تواند به تجمع فسفر منجر شده و سبب آلودگی محیط زیست و هم‌چنین عدم تعادل عناصر غذایی در خاک شود (Afif et al., 1993). استفاده

در عصاره‌های خاک به‌دست آمده به روش اسپکتروفتومتری (Murphy & Riley, 1962) تعیین شد.

تلقیح باکتری‌های حل‌کننده فسفات با خاک

در تحقیق حاضر برای بررسی تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات و استفاده از شکل‌های کم محلول و تبدیل به شکل‌های محلول و قابل جذب از بین ۱۵ نمونه خاک، یک نمونه خاک دارای فسفر کل بالا و فسفر قابل جذب (Olsen-P) پایین انتخاب شد. سپس برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک انتخاب شده به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند.

برای اجرای آزمایش انکوباسیون ابتدا ۱۵۰ گرم از نمونه خاک هوا خشک را درون ظروف پلی‌اتیلن ریخته شد و دهانه ظروف به وسیله درپوش پلاستیک بسته شد تا از تبخیر بیش‌تر رطوبت از نمونه‌ها در طول انکوباسیون و آلودگی میکروبی جلوگیری شود. در روی درپوش‌های پلاستیکی، منافذهای ریز یکنواخت برای تسهیل تبادلات گازی تعبیه شد، سپس ظروف به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ بار داخل اتوکلاو قرار داده شدند. سویه‌های باکتری در محیط کشت پیکوفسکایا (Pikovskaya, 1948) کشت داده شدند و سویه‌هایی با بالاترین میزان شاخص حلالیت و مقدار فسفر آزاد شده نسبت به سایر سویه‌ها (سودوموناس (*Pseudomonas fluorescens*) و باسیلوس (*Bacillus megaterium*)) انتخاب شدند. جیلانی و همکاران (Jilani et al., 2007) نشان دادند که باکتری‌های حل‌کننده فسفات از دو جنس باسیلوس و سودوموناس بوده که موجب افزایش فسفات موجود در خاک و افزایش جذب کل فسفات در گیاه می‌شوند. سویه‌های برتر انتخاب شده از باکتری سودوموناس و باسیلوس موجود در گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه بازکشت شدند. بدین ترتیب که سویه‌های سودوموناس فلورسانس و باسیلوس مگاتریوم با لوپ استریل جدا شده و در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد استریل (NA) کشت شدند. پلیت‌ها در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس به مدت پنج روز انکوبه شدند. پس از آن تمامی سویه‌های رشد کرده در اسلنت‌های حاوی محیط کشت جامد استریل NA کشت شده و پس از سه روز انکوباسیون، در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس در یخچال برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند. سپس سویه‌های موجود اسلنت‌ها (محیط کشت

تازه)، در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد استریل (NA) کشت شدند. پلیت‌ها در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس به مدت پنج روز انکوبه شدند. برای تهیه مایه تلقیح از سویه‌های مورد نظر با لوپ استریل مقداری از کلنی موجود در هر پلیت را برداشته و در دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت (NB) Nutrient Broth مایه‌زنی نموده و سپس براب یکنواخت شدن محیط کشت مایع به‌صورت مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با سرعت ۶۰ دور در دقیقه شیک و مایه تلقیح آماده شد. جمعیت باکتری‌های به‌کار رفته در این آزمایش مجموعاً $10^8 \times 1/3$ سلول در میلی‌لیتر بود. سپس میزان ۱۰ میلی‌لیتر از مایع تلقیح تیمار شده با سویه‌های باکتری (به‌صورت مخلوط) به خاک استریل افزوده و خوب مخلوط شدند (ابراهیمی کریم آباد و همکاران، ۱۳۹۴) و درون ظرف‌های دارای خاک استریل به آرامی ریخته و مخلوط شدند. درون خاک شاهد نیز ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت Nutrient Broth برای حذف اثر محیط کشت اضافه شد. سپس رطوبت نمونه‌ها با افزودن آب مقطر استریل به‌صورت اسپری در ۶۰ درصد رطوبت ظرفیت زراعی تنظیم شدند. ظروف به مدت ۴۵ روز در انکوباتور در دمای ثابت ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در زمان‌های صفر، ۷، ۲۱ و ۴۵ روز بعد از شروع انکوباسیون، ۲۰ گرم از نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌ها برداشته و هواخشک شدند و شکل‌های مختلف فسفر در نمونه‌ها با روش‌های معمول در آزمایشگاه اندازه‌گیری شدند. سویه‌های باکتری (سودوموناس و باسیلوس) مورد نظر از بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه تهیه شد.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با دو تیمار شاهد (بدون تلقیح) و تلقیح (سویه‌های باکتری (سودوموناس و باسیلوس)) و در چهار زمان نمونه‌برداری (صفر، ۷، ۲۱ و ۴۵ روز) در شش تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری شامل آزمون نرمال بودن داده‌ها و اشتباهات، تجزیه واریانس و همبستگی با استفاده از نرم افزارهای MINITAB نسخه ۱۴ و MSTATC انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. ترسیم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

حل کننده فسفات و استفاده از شکل های کم محلول و تبدیل به شکل های محلول و قابل جذب بررسی شود. برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک انتخاب شده در جدول ۲ نشان داده شده است. خاک مورد بررسی دارای کلاس بافتی لوم و متعلق به زیرگروه Typic clacixerpts بود. تجزیه واریانس داده های آزمایش نشان داد که اکثر تیمارهای باکتری در سطح احتمال یک درصد بر شکل های فسفر غیر از شکل معدنی Fe-P معنی دار بود و تأثیر زمان انکوباسیون نیز در سطح احتمال یک درصد بر شکل های فسفر، به غیر از شکل های Fe-P و Al-P معنی دار بود. هم چنین اثر متقابل بین تیمار و زمان انکوباسیون در سطح احتمال یک درصد به غیر از شکل (Fe-P) معنی دار بود (جدول ۳).

مقادیر فسفر کل، فسفر آلی، فسفر معدنی و فسفر اولسن خاک های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. به طور کلی میانگین شکل های معدنی فسفر در خاک های زراعی $Ca_{10}\text{-P}=512$ میلی گرم بر کیلوگرم و به ترتیب ۱/۶، ۱۴، ۱۲ و ۶/۱ و ۶۶ درصد از فسفر معدنی کل را شامل شدند. میانگین فراوانی نسبی فسفر معدنی در فسفات های کلسیم و فسفات های آهن و آلومینیم غیر محبوس و فسفر عصاره گیری شده توسط اسید سولفوریک در خاک های زراعی به صورت ۴/۲: ۱/۱: ۱ بود. در تحقیق حاضر خاک شماره S₁₄ به دلیل داشتن فسفر کل بالا و فسفر قابل جذب (Olsen-P) پایین انتخاب شد تا تأثیر باکتری های

جدول ۱- مقادیر شکل های مختلف فسفر در خاک های مورد مطالعه

Table 1. The values of different forms of phosphorus in studied soils

Soil number	O-P	Olsen-P	Ca ₂ -P	Ca ₈ -P	Al-P	Fe-P	Ca ₁₀ -P	Pt
	(mg kg ⁻¹)							
S ₁	519	23	13	79	86	41	541	1420
S ₂	475	14	6	86	43	31	625	1288
S ₃	530	42	18	217	105	70	179	1387
S ₄	439	22	13	180	187	32	449	1398
S ₅	468	19	11	122	124	12	630	1310
S ₆	532	16	11	211	132	63	555	1630
S ₇	426	22	15	164	83	74	630	1486
S ₈	373	14	6.4	9.4	33	80	471	1078
S ₉	446	28	14	41	118	36	440	1144
S ₁₀	576	18	7	41	47	52	692	1365
S ₁₁	336	11	4	43	125	21	453	1000
S ₁₂	428	15	9	135	107	77	555	1310
S ₁₃	404	11	14	59	68	30	493	1144
S ₁₄	404	12	8.3	81	31	65	449	1354
S ₁₅	576	61	33	173	57	26	524	1321

P_t: فسفر کل؛ O-P: فسفر آلی؛ Olsen-P: فسفر قابل استفاده؛ Ca₁₀-P: آپاتیت؛ Ca₈-P: اکتاکلسیم فسفات؛ Ca₂-P: دی کلسیم فسفات؛ Al-P، فسفات آلومینیم و Fe-P: فسفات آهن.

P_t: total phosphorus, O-P: organic phosphorus, Olsen-P: available phosphorus, Ca₁₀-P: apatite, Ca₈-P: octa-calcium phosphate, Ca₂-P: di-calcium phosphate, Al-P: aluminum bound phosphorus, Fe-P: iron bound phosphorus.

جدول ۲- برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

Table 2. Some physical and chemical of the studied soil

Sampling location	pH	silt	clay	texture	CEC	OC	CCE	ACCE
		%			(cmol _c kg ⁻¹)		%	
Rahdaneh	7.7	20	17	loam	26	0	0.6	6.2

CEC: ظرفیت تبادل کاتیونی؛ CCE: کربنات کلسیم معادل؛ OC: کربن آلی؛ ACCE: کربنات کلسیم فعال
CEC: Cation-exchange capacity, CCE: CaCO₃ equivalent, OC: organic matter, ACCE: CaCO₃ active

جدول ۳- تجزیه واریانس مقادیر فسفر قابل‌استفاده و شکل‌های مختلف فسفر در خاک

Table 3. Analysis of variance for P-Olsen and various phosphorus form in soil

Source of variation	df	Mean square						
		Olsen-P	O-P	Ca ₂ -P	Ca ₈ -P	Al-P	Fe-P	Ca ₁₀ -P
Treatment	1	1115**	903188**	864**	1031**	51.71**	142.80 ^{ns}	42262**
Time	3	1739**	73664**	1961**	4584**	2.23 ^{ns}	89 ^{ns}	611197**
treatment*time	3	520**	115032**	511**	519**	6.54**	16.91 ^{ns}	29021**
Error	40	22.7	2150	3.5	49	1.2	148	1801
CV		15	13	10	11	12	7.6	7.2

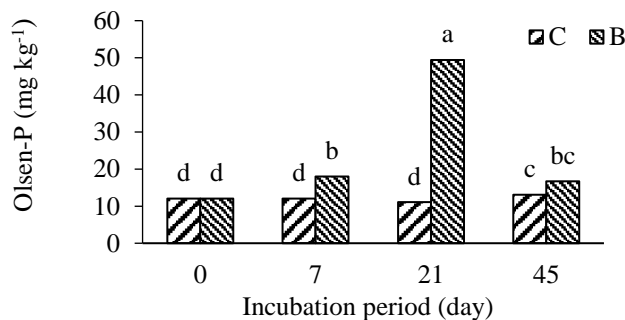
ns, * and **: به ترتیب معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد،

ns, * and **: not significant, significant at $P < 0.05$, and significant at $P < 0.01$, respectively.

نشان داده‌اند که باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توانند تغییر شکل فسفر نامحلول را به فسفر قابل استفاده تسهیل کنند که این سازوکار سبب افزایش غلظت فسفر قابل استفاده و قابلیت استفاده فسفر خاک برای محصولات می‌شود (Gao et al., 2006; Hu et al., 2012). شی و همکاران (Shi et al., 2017) مطالعه‌ای روی تأثیر کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات روی قابلیت استفاده فسفر انجام دادند، نتایج آن‌ها نشان داد که فسفر قابل استفاده (فسفر اولسن) خاک به‌طور معنی‌داری در تیمارهای باکتری‌های حل‌کننده فسفات بیش‌تر از تیمار شاهد بود. هم‌چنین کاهش میزان فسفر قابل استفاده در زمان چهارم می‌تواند ناشی از کاهش مواد غذایی موجود در خاک که باعث کاهش فعالیت ریزجانداران شده و یا تبدیل فسفر قابل جذب به شکل‌های اکتاکالسیوم فسفات و آپاتیت باشد.

تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر فسفر قابل‌استفاده (Olsen-P)

مقایسه میانگین‌های فسفر قابل‌استفاده (Olsen-P) برای اثر متقابل تیمارها و زمان انکوباسیون در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد تیمارهای باکتری و شاهد بین ۱۱ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در خاک بوده است. بیش‌ترین میزان فسفر قابل استفاده در زمان سوم انکوباسیون (۲۱ روز) بوده و در زمان سوم (۲۱ روز) تیمار باکتری به‌طور معنی‌دار میزان فسفر قابل استفاده را ۳/۵ برابر در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد. هم‌چنین در زمان دوم (هفت روز) و زمان چهارم (۴۵ روز) تیمار باکتری به‌ترتیب ۵۱ و ۲۷ درصد میزان فسفر قابل استفاده را در مقایسه با شاهد افزایش داد. اما در زمان صفر میزان فسفر قابل استفاده در تیمار باکتری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد. تحقیقات قبلی نیز



شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر نوع تیمار و زمان انکوباسیون بر فسفر قابل‌استفاده خاک C: شاهد، B: تیمار باکتری

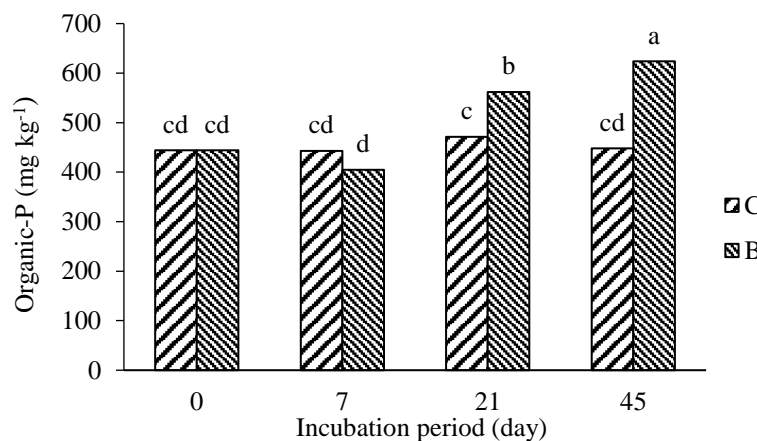
Figure 1. Mean comparison of the effect of treatment type and incubation period on the amount of Olsen-P Soil C and B, respectively control and bacteria treatment.

داشت اما این میزان کاهش از لحاظ آماری معنی‌داری نبود و ممکن است در اثر خطای آزمایشی باشد. در زمان سوم (۲۱ روز) تیمار باکتری ۱۹ درصد افزایش میزان فسفر آلی را نشان داد و در زمان چهارم (۴۵ روز) باکتری منجر به افزایش ۳۹ درصدی فسفر نسبت به تیمار شاهد

تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر فسفر آلی خاک مقایسه میانگین‌های فسفر آلی برای اثر متقابل تیمارها و زمان انکوباسیون بین ۴۵ تا ۶۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم در خاک بود (شکل ۲). در تیمار باکتری در زمان دوم (هفت روز) میزان فسفر آلی تا حدی در مقایسه با شاهد کاهش

فسفر اولسن همبستگی معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴) که بیانگر آن است که فسفر آلی می‌تواند تا اندازه‌ای مورد استفاده گیاه قرار گیرد (Samadi & Gilkes, 1998). اما این منبع فسفر باید قبل از استفاده توسط گیاه معدنی شود. قابلیت استفاده فسفر آلی برای گیاهان در چندین مطالعه نشان داده شده است (Wang *et al.*, 2008; Marschner *et al.*, 2007; Nuruzzaman *et al.*, 2006).

شد. کاهش اولیه در تیمار باکتری می‌تواند متأثر از استفاده باکتری‌ها در زمان دوم از فسفر آلی برای تأمین فسفر مورد نیاز و در زمان‌های بعد تبدیل شکل‌های دیگر به فسفر آلی و استفاده در سلول باکتری‌ها باشد. با بررسی ضریب همبستگی تیمارهای مختلف در تیمار باکتری همبستگی معنی‌داری بین فسفر آلی با فسفر قابل جذب، دی‌کلسیم فسفات و آپاتیت وجود داشت. بین فسفر آلی با



شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیر نوع تیمار و زمان انکوباسیون بر مقدار فسفر آلی خاک

میانگین‌ها دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 2. Mean comparison of the effect of treatment type and incubation period on the amount of organic phosphorus soil.

Means followed by the same superscript letters are not significant different according to Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

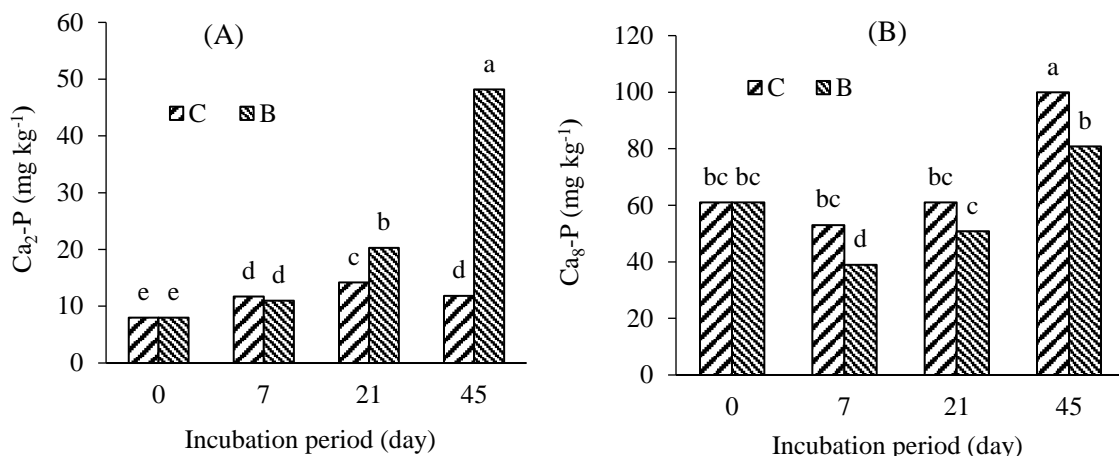
تأثیر باکتری و زمان انکوباسیون برای شکل اکتاکلسیم فسفات نشان داد (شکل ۳-ب) که بیش‌ترین مقدار اکتاکلسیم فسفر در زمان پایان انکوباسیون (۴۵ روز) حاصل شد. در زمان دوم و سوم میزان اکتاکلسیم فسفر در تیمار باکتری به ترتیب ۳۶ و ۱۶ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد اما کاهش مقدار اکتاکلسیم فسفر در زمان سوم (۲۱ روز) در تیمار باکتری در مقایسه با شاهد از لحاظ آماری معنی‌داری نبود. در زمان ۴۵ روز تیمار شاهد با افزایش ۶۳ درصد نسبت به زمان ۲۱ روز میزان اکتاکلسیم را افزایش داد. به‌طور متوسط در زمان‌های مختلف انکوباسیون تیمار باکتری ۲۰ درصد مقدار شکل اکتاکلسیم فسفات را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش داد که این امر احتمالاً به‌دلیل خاصیت حل‌کنندگی باکتری‌های مورد استفاده است که سبب افزایش حلالیت فسفر در مقایسه با شاهد می‌شود. احمدی و همکاران (Adhami *et al.*, 2006)، هم در مطالعات خود روی تعدادی از خاک‌های آهکی ایران نشان دادند که دی

تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر شکل‌های معدنی فسفر

مقایسه میانگین‌های شکل‌های دی‌کلسیم فسفات و اکتاکلسیم فسفر برای اثر متقابل تیمارها و زمان انکوباسیون در شکل ۳-الف و ب نشان داده شده است. نتایج نشان داد در تیمار باکتری با افزایش زمان انکوباسیون مقدار دی‌کلسیم فسفات افزایش یافت. همچنین مقدار دی‌کلسیم فسفات در تیمار باکتری در مقایسه با شاهد، با افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافتند. در زمان سوم (۲۱ روز) که میزان فسفر قابل جذب افزوده شده است، میزان دی‌کلسیم فسفات در باکتری ۴۲ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داده است. در زمان چهارم (۴۵ روز) این تغییرات در تیمار باکتری سه برابر نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش میزان دی‌کلسیم فسفات شد. این افزایش به دلیل افزایش میزان فسفر قابل جذب در زمان سوم و تبدیل شکل‌های دیگر به دی‌کلسیم فسفات بوده است (شکل ۳-الف). مقایسه میانگین‌های اثر

تبدیل می‌شود (Adhami *et al.*, 2006). احتمالاً در ۴۵ روز در تیمارهای باکتری، افزایش فعالیت باکتری‌ها و ترشح آنزیم توسط آن‌ها به‌عنوان مهم‌ترین عامل در افزایش سطح دی‌کلسیم فسفات خاک باشد.

کلسیم فسفات کمترین بخش فسفات‌های کلسیمی این خاک‌ها را تشکیل می‌دهد. فسفر حاصل از معدنی شدن مواد آلی و بقایای گیاهی در خاک‌ها نیز ضمن افزایش سطح فسفر محلول خاک، ابتدا به دی‌کلسیم فسفات



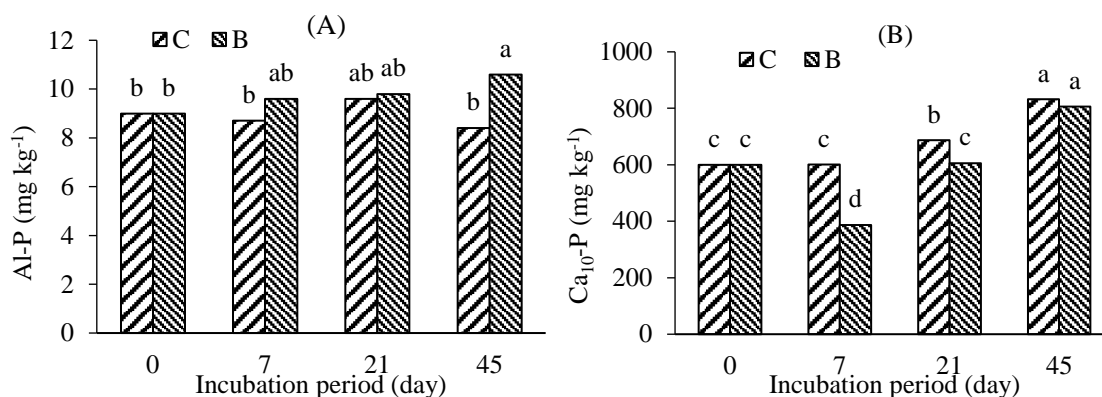
شکل ۳- مقایسه میانگین تاثیر نوع تیمار و زمان انکوباسیون بر مقدار دی‌کلسیم فسفات (الف) و اکتاکلسیم فسفات (ب) میانگین‌ها دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 3. Mean comparison of the effect of treatment type and incubation period on the amount Ca₂-P (A) and Ca₈-P (B).

Means followed by the same superscript letters are not significant different according to Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

مقدار آپاتیت پنج درصد کاهش نسبت به زمان اول نشان داد. اما در زمان چهارم (۴۵ روز) و زمان اول (صفر) تفاوت معنی‌داری بین تیمار باکتری و شاهد مشاهده نشد (شکل ۴-الف). مقدار آپاتیت در زمان ۲۱ روز در تیمار شاهد (بدون تلقیح) به میزان ۱۵ درصد افزایش داشت. تیمار باکتری در زمان ۲۱ روز، ۱۰ درصد مقدار آپاتیت را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. در زمان چهارم تیمار شاهد با افزایش ۳۸ درصدی نسبت به زمان اول (صفر) شاهد، مقدار آپاتیت را به بیش‌ترین سطح آن معادل ۸۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک رساند. فوٹ و الیس (Foth & Ellis, 1997) بخش اعظم فسفر در خاک‌های آهکی را از نوع شکل معدنی آپاتیت دانستند. فراوانی این شکل معدنی نسبت به سایر اشکال توسط مستشاری و همکاران (Mostashari, 2009) گزارش گردید.

مقایسه‌ی میانگین‌های تیمار باکتری برای اثرات متقابل تیمار و زمان در زمان‌های انکوباسیون صفر، ۷ و ۲۱ روز تاثیری بر مقدار فسفات آلومینیم نداشت چون از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین تیمار باکتری و شاهد در این زمان‌ها وجود نداشت. اما تیمار باکتری در زمان چهارم (۴۵ روز) با ۱۷ درصد نسبت به تیمار شاهد میزان آلومینیم فسفات را کاهش داد (شکل ۴-الف). احمدی و همکاران (Adhami *et al.*, 2006)، بیان کردند که آپاتیت، بخش غالب فسفات‌های کلسیمی در تعدادی از خاک‌های آهکی ایران را تشکیل می‌دهد. مقایسه میانگین میزان آپاتیت در زمان‌های مختلف انکوباسیون در شکل ۴-ب نشان داده شده است. نتایج نشان داد، بیش‌ترین میزان کاهش آپاتیت از لحاظ آماری بین زمان‌های مختلف در زمان دوم (هفت روز) انکوباسیون با ۳۷ درصد نسبت به زمان اول انکوباسیون بود. در زمان سوم (۲۱ روز) این



شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر نوع تیمار و زمان انکوباسیون بر مقدار فسفات آلومینیم (الف) و آپاتیت (ب)

میانگین‌ها دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 4. Mean comparison of the effect of treatment type and incubation period on the amount Al-P (A) and Ca₁₀-P (B).

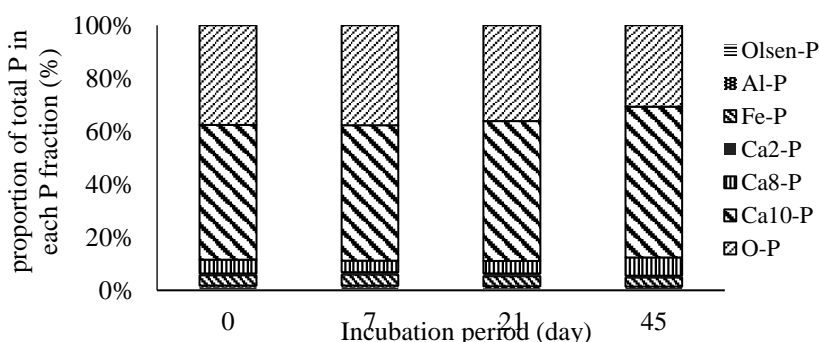
Means followed by the same superscript letters are not significant different according to Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

توزیع شکل‌های فسفر تحت اثر تیمارها و زمان‌های مختلف

مقدار توزیع شکل‌های مختلف فسفر در خاک به سن خاک، مواد مادری، زمان کوددهی، درجه هواپدگی و عوامل اقلیمی دیگر بستگی دارد (Samadi, 2003). توزیع شکل‌های فسفر در تیمارهای شاهد و باکتری در زمان‌های صفر، ۷، ۲۱ و ۴۵ روز در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است.

شکل‌های (Ca₂-P)، (Ca₈-P) و (Ca₁₀-P) در تیمار شاهد در زمان‌های مختلف تغییر یافتند اما در شکل‌های دیگر فسفر تغییر محسوسی مشاهده نشد (شکل ۵). میزان شکل‌های فسفر در زمان اول در تیمار شاهد، به صورت Ca₁₀-P > O-P > Ca₈-P > Fe-P > Olsen-P > Al-P >

Ca₂-P بوده است. در زمان دوم و چهارم میزان شکل‌های فسفر به صورت Olsen-P > Fe-P > Ca₈-P > O-P > Ca₁₀-P > Al-P > Ca₂-P تغییر یافت. در زمان سوم این تغییرات به صورت Olsen-P > Al-P > Ca₁₀-P > O-P > Ca₈-P > Fe-P > Ca₂-P مشاهده شد. در تیمار شاهد تغییرات محسوسی با زمان در میزان فسفر قابل استفاده (Olsen-P) و فسفر آلی (O-P) مشاهده نشد ولی میزان فسفات‌های کلسیم افزایش نشان داد. این افزایش فسفات‌های کلسیم بیانگر تثبیت فسفر در خاک است. هرچه میزان رس و آهک خاک بیش‌تر باشد، میزان فسفر تثبیت شده در خاک بیشتر است (Tiessen *et al.*, 1984).



شکل ۵- توزیع نسبی شکل‌های فسفر حاصل از عصاره‌گیری متوالی در خاک شاهد در زمان‌های مختلف انکوباسیون

Figure 5. Relative distribution of phosphorus forms from continuous extraction in control soil at different incubation periods.

توزیع شکل‌های فسفر به این ترتیب Ca₁₀-P > O-P > Ca₈-P > Fe-P > Olsen-P > Al-P > Ca₂-P بود. در زمان

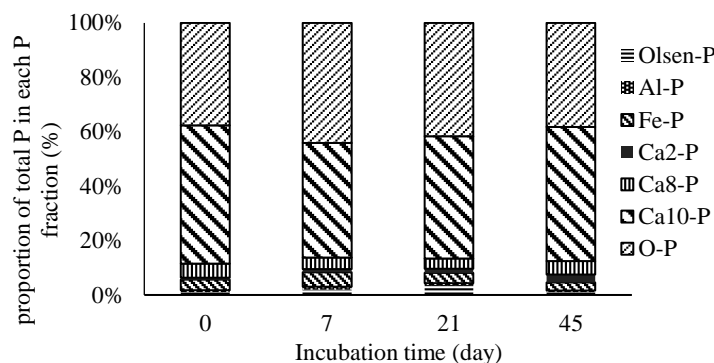
شکل ۶ بیانگر تغییرات شکل‌های فسفر طی زمان‌های مختلف تحت اثر تیمار باکتری است. در زمان اول میزان

1998) فسفر اولسن تقریباً فسفر قابل استفاده بوده که توسط گیاه در خاک‌های آهکی جذب می‌شود (Delgado *et al.*, 2000). سماواتی و حسین‌پور (Samavati & Hossinpur, 2006) گزارش کردند که فسفر قابل استفاده به‌طور معنی‌داری دارای همبستگی با شکل‌های دی‌کلسیم فسفات، اکتاکلسیم فسفات، فسفات آلومینیوم و فسفات آهن بود. هوکر و همکاران (Hooker *et al.*, 1980)، نیز گزارش کردند که شکل‌های مختلف فسفر با فسفر اولسن همبستگی داشتند. صمدی و گیلکس (Gilkes, 1998) و صمدی (Samadi, 2003)، نشان دادند که در خاک‌های آهکی، فسفر (Olsen-P) با دی‌کلسیم فسفات، فسفات آلومینیوم، فسفات آهن و آپاتیت همبستگی معنی‌داری دارد. با بررسی ضریب همبستگی تیمارهای مختلف، در تیمار باکتری همبستگی مثبت و معنی‌داری ($p < 0.01$) ($r = 0.89$) بین فسفر (P-O) با فسفر (Olsen-P)، (Ca₂-P) و (Ca₁₀-P) وجود دارد. همبستگی معنی‌داری بین فسفر (P-O) با فسفر اولسن بیانگر آن است که فسفر (P-O) می‌تواند تا اندازه‌ای مورد استفاده گیاه قرار گیرد (Samadi & Gilkes, 1998). نتایج مشابهی توسط دیگران گزارش شده است (Afif *et al.*, 1993). با توجه به جدول ۴، همبستگی مثبت و معنی‌داری ($p < 0.01$) ($r = 0.92$) بین دی‌کلسیم فسفات با فسفر قابل جذب، فسفات آهن، فسفات آلومینیوم و اکتاکلسیم فسفات در تیمار باکتری وجود دارد. هم‌چنین دی‌کلسیم فسفات با آپاتیت، آلومینیوم فسفات، اکتاکلسیم فسفات و فسفر آلی همبستگی منفی و معنی‌داری ($p < 0.01$) ($r = 0.88$) وجود دارد. مقدار Ca₂-P در مقایسه با سایر شکل‌ها بسیار پایین بوده علت این امر آن است که دی‌کلسیم فسفات در خاک بسیار ناپایدار بوده و به سایر ترکیبات فسفر معدنی تبدیل می‌شود (Lindsay, 1982). با توجه به جدول ۴، در تیمار باکتری همبستگی معنی‌داری بین اکتاکلسیم فسفات با آپاتیت وجود دارد ($p < 0.05$) ($r = 0.80$). هم‌چنین همبستگی مثبت و معنی‌داری ($p < 0.01$) ($r = 0.82$) بین فسفات آلومینیوم با فسفر قابل جذب و دی‌کلسیم فسفات وجود این همبستگی‌ها وجود دارد. در تیمار باکتری همبستگی‌های موجود بیانگر وجود رابطه تعادلی بین این شکل‌ها بود (Tiessen *et al.*, 1984). نتایج مشابهی توسط دیگر محققین گزارش شده است (Samadi & Gilkes, 1998).

دوم توزیع شکل‌های به‌صورت $O-P > Ca_{10}-P > Fe-P > Ca_8-P > Olsen-P > Ca_2-P > Al-P$ بود و هم‌چنین در این زمان میزان آپاتیت کاهش چشم‌گیری داشت. میزان فسفر قابل جذب (Olsen-P) و (Ca₂-P) تا ۲۵ درصد افزایش نشان داد. در زمان سوم توزیع شکل‌های فسفر به‌صورت $Ca_{10}-P > O-P > Ca_8-P = Fe-P > Olsen-P > Ca_2-P > Al-P$ بود. در این زمان میزان فسفر آلی ۱۹ درصد، میزان فسفر قابل جذب (Olsen-P) ۳/۵ برابر و میزان (Ca₂-P) ۲/۵ برابر شد. میزان آپاتیت (Ca₁₀-P) به سطح اولیه برگشت. در زمان چهارم توزیع شکل‌های مختلف فسفر $Ca_{10}-P > O-P > Ca_8-P > Ca_2-P = Fe-P > Olsen-P > Al-P$ بود. میزان (Ca₂-P) تا شش برابر افزایش نسبت به زمان اول و ۲/۵ نسبت به زمان سوم افزایش قابل توجهی داشت. میزان فسفر قابل جذب (Olsen-P) سه برابر نسبت به زمان قبل کاهش نشان داد ولی میزان آن در پایان انکوباسیون ۲۸ درصد از سطح اولیه بیش‌تر شد و هم‌چنین میزان فسفر آلی با رشد ۴۰ درصدی روبرو بود. در زمان‌های اولیه به دلیل استفاده باکتری‌ها از منابع آلی خاک میزان فسفر آلی کاهش نشان داد و طی زمان‌های بعدی با جذب فسفر از شکل‌های آپاتیت (Ca₁₀-P)، دی-کلسیم فسفات (Ca₂-P) و فسفر قابل جذب (Olsen-P) و تبدیل آن به فسفر آلی (O-P)، میزان فسفر آلی در خاک افزوده شد. به دلیل میزان پایین کربن خاک (۰/۶ گرم بر کیلوگرم خاک) و با تمام شدن ذخایر کربن میزان فعالیت باکتری‌ها کاسته و شکل‌های محلول ناپایدار به شکل‌های کم محلول پایدار تبدیل شده و میزان شکل‌های با حلالیت کم، در زمان‌های آخر افزایش پیدا کرد. همبستگی‌های معنی‌دار بین شکل‌های مختلف فسفر با یکدیگر بیانگر این است که بین این شکل‌ها در خاک‌های مورد مطالعه یک رابطه دینامیکی برقرار است (Tiessen *et al.*, 1984).

همبستگی شکل‌های فسفر تحت اثر تیمارها و زمان‌های مختلف

برای نشان دادن ارتباط شکل‌های مختلف فسفر با یکدیگر، ضریب همبستگی آنها تعیین شد (جدول ۴). نتایج نشان داد در تیمار باکتری همبستگی معنی‌داری ($p < 0.01$) ($r = 0.84$) بین فسفر قابل جذب با فسفر آلی، دی‌کلسیم فسفات و آلومینیوم فسفات وجود دارد که نشان‌دهنده آزاد شدن فسفر از این شکل‌ها در مدت عصاره‌گیری فسفر قابل جذب است (Samadi & Gilkes, 1998).



شکل ۶- توزیع نسبی شکل‌های فسفر حاصل از عصاره‌گیری متوالی در خاک تیمار با باکتری در زمان‌های مختلف انکوباسیون
Figure 6. Relative distribution of phosphorus forms from continuous extraction in soil treatment with bacteria at different incubation periods.

جدول ۴- ضریب همبستگی ساده (r) بین شکل‌های مختلف فسفر در تیمار شاهد و باکتری

Table 4. Simple correlation coefficient (r) between different forms of phosphorus in treatment of control and bacteria

Phosphorus forms	P-O	Ca ₂ -P	Ca ₈ -P	Al-P	Fe-P	Ca ₁₀ -P
Olsen-P	0.84**	0.84**	- 0.38	0.80*	0.68	- 0.17
Ca ₁₀ -P	0.82*	0.30	0.80*	- 0.11	- 0.23	
Fe-P	0.59	0.92**	0.54	0.59		
Al-P	0.57	0.82*	- 0.62			
Ca ₈ -P	0.35	- 0.40				
Ca ₂ -P	0.89**					

** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد،

* and **: significant at $p < 0.05$, and significant at $p < 0.01$, respectively.

باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس باعث تغییر در میزان شکل‌های فسفر معدنی و آلی شد. تیمار باکتری فسفر قابل جذب را ۳/۵ برابر افزایش داد و در زمان آخر (۴۵ روز) با افزایش ۴۰ درصدی نسبت به سطح اولیه میزان فسفر قابل جذب (Olsen-P) را افزایش داد. این تیمار مقدار دی‌کلسیم فسفات (Ca₂-P) را تا ۶/۲ برابر افزایش داد و هم‌چنین میزان آپاتیت (Ca₁₀-P) در این تیمار تا ۳۷ درصد کاهش پیدا کرد. به‌طور کلی تلقیح باکتریایی سبب افزایش شکل‌های قابل‌استفاده فسفر برای گیاه شده و هم‌چنین سبب افزایش بازدهی کودهای فسفر، کاهش پدیده آلودگی محیط زیست و حفظ و توسعه کشاورزی پایدار می‌شود. پیشنهاد می‌شود از این سویه‌ها به‌صورت کشت با گیاه به همراه استفاده از مواد آلی برای پی بردن به اثرات متقابل گیاه، مواد آلی و ریزجانداران بر شکل‌های فسفر و قابلیت‌های تیمارها مورد استفاده قرار گیرند.

به‌طور کلی حل‌کننده‌ها با استفاده از کاهش pH محیط توسط اسیدهای آلی، فرایند کلات و فرایند واکنش‌های تبدیلی به افزایش حلالیت فسفات‌های نامحلول کمک می‌کند (Sharma, 2011). کاهش pH، تولید اسید آلی و فسفاتاز از سازوکارهای اصلی باکتری‌های حل‌کننده فسفات است باکتری‌ها با تولید اسید آلی (lactic, succinic, isovaleric, isobutyric and acetic acids) که توسط سویه‌های حل‌کننده فسفات ساخته می‌شود، شکل‌های کم محلول را به‌صورت شکل‌های محلول فسفات تغییر می‌دهد (Vazquez et al., 1999).

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از ریزجانداران باعث تغییر در میزان فسفر و تبدیل و استفاده از شکل‌های معدنی و آلی فسفر شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از

References

- Abdelrahman M., Abdel-Motaal F., El-Sayed M., Jogaiah S., Shigyo, M., Ito S., et al. 2016. Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. cepa by target metabolite profiling. *Plant Science*, 246: 128–38.
- Adhami E., Maftoun A., Ronaghy N., Karimian J., and Assad, T. 2006. Inorganic phosphorus fractionation of highly calcareous soils of Iran. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37: 1877- 1888.
- Afif E., Matar A., and Torrent T. 1993. Availability of phosphate applied to calcareous soil. Soils of west Asia and North Africa. *Soil Science Society American Journal*, 57: 756-776.
- Alam S., Khalil S., Ayub N., and Rashid, M. 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphorus by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4: 454-458.
- Chang S.C., and Jackson M.L. 1957. Fractionation of soil phosphorus. *Soil Science*, 84: 133-144.
- Chen Z., Ma S., and Liu L.L. 2008. Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. *Bioresource Technology*, 99: 6702–6707.
- Dean L.A. 1949. Fixation of soil phosphorus. *Advances in Agronomy*, 1: 391-411.
- Delgado, A.J., R. Ruiz, M.C. Campillo, S. Kassem and L. Andreu, 2000. Calcium-and iron related phosphorus in calcareous and calcareous marsh soils: Sequential Chemical Fractionation and P nuclear magnetic resonance study. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31: 2483-2499.
- Dehgan R., Shariatmadari H., and Khademi, H. 2008. Soil phosphorus forms in four toposequence of Isfhan and Shahrekord regions. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 11(42): 463-472.
- Drouineau G. 1942. Dosage rapide du calcaire du sol, nouvelles donnees sur la separation et la nature des fractions calcaires. *Annals Agronomy*, 12: 441-450.
- Fallah A. 2006. Abundance and distribution of phosphate solubilizing bacteria and fungi in some soil samples from north of Iran. 18th World Congress of Soil Science, July 9-15, 2006, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Foth H.D. and Ellis B.G. 1997. Soil Fertility .2nd Edition, CRC. Press. Boca, Raton, Florida 290p.
- Guo F., Yost R.S., Hue N., Evensen C.I. and Silva J. A. 2000. Changes in phosphorus fractions in soils under intensive plant growth. *Soil Science Society of America*, 64: 1681-1689.
- Gao C.H., Lu C.D., and Zhang Q. 2006. Effects of phosphate liberation bacteria on crop growth and phosphate in soil. *Journal of Soil and Water Conservation*, 20: 54–56.
- Gee G.W., and Bauder J.W. 2002. Particle size analysis. In Jacob, H. D., and Clarke, G (ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 4, Physical Methods*, SSSA. Madison, WI. pp. 201-214.
- Ghaderi A., Aliasgharzad N., Oustan S., and Olsson P.A. 2008. Efficiency of three *Pseudomonas* isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide). *Soil Environment*, 27:71-76.
- Golmohammad H., Ramezanpour H., and Rezapour, S. 2016. Study on Some Soil Properties as Affected by Different Slope Position and Aspect in Mountainous Landform with Different Parent Materials in Masouleh. *Water and Soil Science*, 26: 53-63. (In Persian)
- Halajnia A., Haghnia G. H., Fotovat A., and Khorasani, R. 2009. Phosphorus fractions in calcareous soils amended with P fertilizer and cattle manure. *Geoderma*, 150: 209–213.
- Hooker M.L., Peterson G.A., Sander D.H., and Digger L.A. 1980. Phosphate fractions in calcareous soils as altered by time and amounts of added phosphate. *Soil Science Society American Journal*, 44: 206- 272.
- Hu X.F., He Y.S., and Yue N. 2012. Effects of different phosphate solubilizing bacteria bio-fertilizers on growth of maize seedling and available phosphorus concentration in soil. *Human Agricultural Science*. 42:74–77
- Jiang B., and Gu Y. 1989. A suggested fractionation scheme of inorganic phosphorus in calcareous soils. *Fertilizer Research*, 20: 159-165.

- Jilani G., Akram A., Ali R.M., Hafeez F.Y., and Shamsi I.H. 2007. Chaudhry AN, Chaudhry AG. Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial rhizosphere microflora through organic and biofertilizers. *Annals of Microbiology*, 57: 177-181.
- Khan K.S., and Joergensen, R.G. 2009. Changes in microbial biomass and P fractions in biogenic household waste compost amended with inorganic P fertilizers. *Bioresource Technology*, 100:303-309.
- Khan M.S., Zaidi A., and Wani P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 27:29-43.
- Kong Y., Nielsen J.L., and Nielsen P.H. 2005. Identity and ecophysiology of uncultured Actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 4076-4085.
- Lindsay W.L. 1982. Chemical Equilibria in soils. John Wiley and Sons. Inc., NewYork.
- Marschner P., Solaiman Z., and Rengel Z. 2007. Brassica genotypes differ in growth, phosphorus uptake and rhizosphere properties under P-limiting conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 87-98.
- Mehra P., Pandey B.K., and Giri J. 2015. Genome-wide DNA polymorphisms in low phosphate tolerant and sensitive rice genotypes. *Scientific Reports*, 5: 13090.
- Mostashari M. 2009. Evaluation of the efficiency of phosphorus uptake of calcareous soil in the planting process. Ph.D Thesis, Department of Soil Science, Agricultural Faculty. University of Tehran. 83p. (In Persian)
- Murphy J., and Riley J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry Acta journal*, 27: 31-36.
- Nuruzzaman M., Lambers H., Bolland M.D.A., and Veneklaas E.J. 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant and Soil*, 281: 109-12.
- Olsen S.R., Cole C.V., Watanabe F.S., and Dean L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. USDA. Cire.939.U.S.Gov.Print office, Washington, DC.
- Page A.L., Miller R.H., and Keeney D.R. 1982. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological methods. *Agronomy and Soil Science Society of America*. Pub. Madison, WI. U.S.A.
- Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologia*, 17: 362-370.
- Pradhan N., and Sukla L.B. 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10): 850-854.
- Rayment G.E., and Higginson F.R. 1992. Oxalat – extractable Fe and Al. In: “Australian Laboratory Handbook of Soil and Water Chemical Methods”. Inkata Press, pp. 137-151.
- Richardson A.E., and Simpson R.J. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiology*, 156(3):989–96.
- Samadi A. 2003. A study on distribution forms of phosphorus in calcareous soils of Western Australia. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 5: 39-49.
- Samadi A., and Gilkes R.J. 1998. Forms of phosphorus in virgin and fertilized calcareous soils of Western Australia. *Australian Journal of Soil Research*, 36: 585-601.
- Samavati, M. and A.R. Hossinpur, 2006. Phosphorus effect on Ca-P in fractions in selected soils of Hamedan Province and their correlation with available phosphorus. *Iranian Iranian Journal of Soil and Water Science*, 20: 234-248.
- Sharma K., Dak G., Agrawal A., Bhatnagar M., and Sharma R. 2011. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of Cicer arietinum seeds and seedling growth. *Journal of Herbal Medicine*, 1:61-63.
- Shi X.K., Ma J.J., and Liu L.J. 2017. Effects of phosphate-solubilizing bacteria application on soil phosphorus availability in coal mining subsidence area in Shanxi. *Journal of Plant Interactions*, 12: 137–142.
- Sudisha J., Mostafa A., Phan T.L.S., and Shin-Ichi, I. 2018. Different mechanisms of Trichoderma virens-mediated resistance in tomato against Fusarium wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology*, 19(4):870–82.
- Tao G., Tian S., Cai M., and Xie, G. 2008. Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, 18: 515-523.

- Tiessen H., Stewart J.W.B., and Cole C.V. 1984. Pathways of phosphorus transformations in soils of differing pedogenesis. *Soil Science Society of America Journal*, 48: 853–858.
- Turan M., Ataoğlu N., and Şahin F. 2007. Effects of Bacillus FS-3 on growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and availability of phosphorus in soil. *Plant, Soil and Environment*, 53: 58-64.
- Vazquez P., Holguin G., Puente M., Cortes A.E., and Bashan Y. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi-arid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 460-468.
- Walker T.W., and Adams A.F.R. 1958. Studies on soil organic matter: I. Influence of phosphorus content of parent material on accumulation of carbon, nitrogen, sulfur and organic phosphorus in grassland soils. *Soil Science*, 85: 307-318.
- Walky A., and Black I.A. 1934. An examination of Degtareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid in soil analysis. 1. Experimental. *Soil Science Society American Journal*, 79: 459-465.
- Wang X., Tang C., Guppy C.N., and Sale P.W.G. 2008. Phosphorus acquisition characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) wheat (*Triticum aestivum* L.) and white lupin (*Lupinus albus* L.) under P deficient conditions. *Plant and Soil*, 312: 117–128.
- Yadav H., Fatima R., Sharma A., and Mathur S. 2017. Enhancement of applicability of rock phosphate in alkaline soils by organic compost. *Applied Soil Ecology*, 113: 80–85.
- Zhang D., Song H., Cheng H., Hao D., Wang H., Kan G., Jin H., and Yu D. 2014. The acid phosphatase-encoding gene GmACPI contributes to soybean tolerance to low-phosphorus stress. *PLOS Genetics*, 10(1): e1004061. doi:10.1371/journal.pgen.1004061.

Effect of Phosphate-Solubilizing Bacteria (PSB) on Distribution of Phosphorus Forms in a Calcareous Soil

Neda Moradi^{1*}, MirHassan Rasouli-Sadaghiani²

(Received: February 2018 Accepted: Jun 2019)

Abstract

Recognition of the distribution of various phosphorus forms influenced the activity of microorganisms in soil is essential for better understanding of their capacity to maintain and provide phosphorus for plants. In this study to investigate the role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in the distribution of different forms of soil phosphorus, a surface soil sample (0-30 cm) were selected in West Azarbaijan with a loamy texture, Belongs to the Typic clacixerpts subgroup. An experiment was conducted as a factorial in a completely randomized design with two factors: Microbial treatments (control (no inoculation) and bacterial strains (*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus megaterium*) and sampling time (0, 7, 21, 45 days) in six replications. Soil samples were incubated at 28 ° C for a period of 45 days. Then, different forms of inorganic phosphorus, organic phosphorus and Olsen phosphorus were determined by sequential extraction method. Soil pH value 7.7, Clay soil tested 17% and activated calcium carbonate in soil 3.5%. Ca₁₀-P formed was 45% of total phosphorus in the soil and indicates its importance in the calcareous soil. The results showed that the bacterial treatment caused significant changes in the amount of phosphorus, organic phosphorus and mineral phosphorus, the amount of available phosphorus, organic phosphorus and mineral form (di-calcium phosphate (Ca₂-P)) in bacterial inoculation compared to control treatment increased 66, 15 and 92%, respectively. However, the octa-calcium phosphate (Ca₈-P) and apatite (Ca₁₀-P) forms in the treatment of bacteria were reduced 13 and 5%, respectively. In addition, the Al -P form was increased 10% compared to control in bacteria treatment. In the treatment of bacterial significant correlation (r=0.84**) between P (Olsen-P) and (Ca₂-P, O-P, and Al-P) was present in the soil. The amount of phosphorus in different forms in the treatment of bacteria was as O-P> Ca₁₀-P> Ca₈-P> Olsen-P> Ca₂-P> Al-P at the end of incubation. The results showed that inoculation of bacterial, increase the solubility of the available phosphorus forms in the soil.

Key words: Available phosphorus, *Bacillus*, Sequential extraction, *Pseudomonas*

Moradi N., Rasouli-Sadaghiani M.H. 2019. Effect of Phosphate-solubilizing bacteria (PSB) on distribution of phosphorus forms in a calcareous soil. *Applied Soil Research*, 7(2): 67-81.

1- Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2- Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

* Corresponding Author Email: n.moradi@scu.ac.ir