

جداسازی میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات از ریزوسفر گندم و بررسی توان حل‌کنندگی آنها در دو منبع فسفات نامحلول

راضیه ابراهیمی کریم آباد^۱، میرحسن رسولی صدقیانی^{۲*}، محسن برین^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲)

چکیده

فسفر یکی از عناصر ضروری برای رشد گیاهان بوده و در اغلب خاک‌ها رفتار پیچیده‌ای داشته و با اجزا خاک بصورت ترکیبات کم محلول تا نامحلول در می‌آید. بهره‌برداری از پتانسیل بیولوژیک خاک‌ها می‌تواند حلالیت و تحرک آن را برای تغذیه مطلوب گیاهان فراهم نماید. این تحقیق به منظور جداسازی و غربالگری سویه‌های باکتریایی (PSB) و قارچی (PSF) حل‌کننده فسفات از نظر توان انحلال فسفات‌ها در حضور دو منبع تری‌کلسیم فسفات (TCP) و خاک فسفات (RP) انجام گردید. تعداد ۵۵ نمونه ریزوسفری از مزارع گندم ارومیه برداشت و جداسازی اولیه و ارزیابی توان حل‌کنندگی بصورت کیفی در محیط کشت جامد NBRIP انجام شد. توانایی انحلال کمی سویه‌های کارآمد در آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل منبع فسفات (TCP و RP) و تلقیح میکروبی (شاهد، PSB₄₅، PSB₁₅، PSB₃₀، PSB₂، PSB₁₁، PSB₁₂، PSB₂₀، PSF₁، PSF₃، PSF₄ و PSF₇) در هفت زمان انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور (۰، ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روز) مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که منبع فسفات، سویه‌های میکروبی و زمان انکوباسیون تاثیر معنی‌داری ($P < 0.001$) بر مقادیر فسفر حل‌شده و pH محیط داشت. بیشترین میزان فسفر محلول با ۶۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط سویه PSF₁ از منبع تری‌کلسیم فسفات آزاد شد. همچنین سویه PSF₁ در روز دوازدهم با ۵۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین توان حلالیت را نسبت به سایر سویه‌ها نشان داد. میزان فسفر حل‌شده توسط سویه‌ها با pH محیط کشت رابطه‌ی خطی منفی و معنی‌داری نشان داد. میزان pH در نمونه تلقیح شده با سویه PSF₁ در منبع تری‌کلسیم فسفات بیشترین مقدار کاهش (۴ واحد) را نسبت به سایر سویه‌ها و تیمار شاهد نشان داد و همچنین بیشترین کاهش pH در روز دوازدهم ($pH = 3/90$) توسط همین سویه مشاهده شد در حالی که میزان pH در تیمار شاهد بدون تغییر باقی ماند.

واژه‌های کلیدی: باکتری، خاک، شاخص حلالیت، فسفر، قارچ

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۲- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه (مکاتبه کننده)

۳- استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

*پست الکترونیک: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir

مقدمه

یکی از راه‌های موثر برای افزایش قابلیت جذب فسفر در خاک‌های قلیایی می‌باشد (Molla *et al.*, 2001). ترکیبات فسفات نامحلول می‌توانند با اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتازی که توسط ریشه گیاهان و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند، انحلال یابند (Sharma, 2005). در بین باکتری‌هایی با توانایی حل فسفات، جنس‌های *Pseudomonas* (Rasi Poor & Aliasgharzad, 2005;)، *Bacillus* (Ghaderi *et al.*, 2008)، *Pantoea* (Alikhani *et al.*, 2006)، *Rhizobium* (Jung *et al.*, 2002)، *Burkholderia* (Oliveria *et al.*,)، *Achromobacter* (2009)، *Agrobacterium* و *Flavobacterium* (Rodriguez & Fraga, 1999) دارای اهمیت هستند. قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها نقش موثرتری در حل نمودن فسفات دارند (Vazquez *et al.*, 2000). مهم‌ترین قارچ‌های حل‌کننده فسفات از جنس *Aspergillus* (Narsian & Patel, 2000; Goenadi *et al.*,)، *Penicillium* (Reddy *et al.*, 2002; 2000; Asea & Kucey, 1988; Cunningham &)، *Trichoderma* (Kuiack, 1992; Whitelaw *et al.*, 1999) می‌باشند. مکانیسم اثر این میکروارگانیسم‌ها در انحلال فسفات‌های نامحلول پیچیده است، ولی براساس نظرات محققان، این میکروارگانیسم‌ها با اکسیداسیون ناقص قندها، اسیدهای آلی تولید می‌کنند که باعث کاهش pH محیط می‌شوند که تولید اسیدهای آلی، تولید پروتون و ایجاد کلات توسط باکتری‌ها و قارچ‌های ساپروفیت حل‌کننده فسفات‌های معدنی کاملاً ثابت شده می‌باشد و به‌عنوان مکانیسم اصلی انحلال فسفات‌های معدنی توسط این میکروارگانیسم‌ها تشخیص داده شده است (Rodriguez & Fraga, 1999; Nahas, 1996). اسیدهای آلی تولید شده از دو طریق باعث افزایش فسفر قابل دسترس می‌شوند که یکی از طریق کاهش pH در منطقه ریزوسفر است و دیگری از طریق کلاته شدن یون آلومینیم در خاک‌های اسیدی و یون کلسیم در خاک‌های قلیایی است (Kucey, 1983). باکتری‌های حل‌کننده فسفات از طریق تولید اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین (عمدتاً گلوکونیک و کتوگلوکونیک اسید) باعث کاهش pH ریزوسفر خاک می‌شوند. pH ریزوسفر از طریق تولید پروتون، بی‌کربنات و آزادسازی گازهای (CO₂ و O₂) کاهش می‌یابد (Doubel

فسفر یکی از عناصر ضروری برای رشد و بهره‌وری گیاهان می‌باشد که نقش مهمی در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی از قبیل تقسیم سلولی، فتوسنتز، توسعه سیستم ریشه‌ای و مصرف کربوهیدرات در گیاهان ایفا می‌کند (Sharma *et al.*, 2011). گرچه فسفر در خاک به مقدار فراوان و به دو شکل آلی و معدنی یافت می‌شود، اما به‌طور عمومی درگیر واکنش‌های جذب و رسوب در خاک می‌باشد. بنابراین با وجود بالا بودن مقدار فسفر کل خاک، غلظت فسفر قابل استفاده پایین است (Miyasaka & Miyasaka, 2001). گیاهان این عنصر را بیشتر بصورت آنیون فسفات (H₂PO₄⁻ و HPO₄²⁻) جذب می‌کنند. این عنصر بر خلاف سایر عناصر پر مصرف تحرک کمتری در خاک دارد (Sharma *et al.*, 2011). بنابراین در اغلب خاک‌های کشاورزی، فسفر بعنوان عنصر غذایی محدودکننده می‌باشد (Guinazu *et al.*, 2010). طبیعت خاک‌های آهکی که بخش عمده‌ای از اراضی زراعی و باغی کشورمان را شامل می‌گردد، باعث شده است که کودهای شیمیایی فسفره از کارایی کمتری برخوردار بوده و برای همین منظور کشاورزان هر ساله مقادیر قابل توجهی از این نهاده شیمیایی را به اراضی زیر کشت اضافه نمایند (Rejali *et al.*, 2010). این درحالی است که منابع سهل‌الوصول کودهای فسفات در دنیا رو به کاهش است و پیش بینی می‌شود طی ۷۰-۸۰ سال آینده به اتمام برسد (Vance *et al.*, 2003). با توجه به کارایی اندک، افزایش قیمت جهانی و وارداتی بودن بخش عمده کودهای شیمیایی و همچنین آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف این کودها، استفاده از خاک فسفات به عنوان کود فسفاتی در سال‌های اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Abd-Elmonem & Amberger, 2000). متأسفانه خاک‌فسفات در خاک‌هایی با pH بالای ۶-۵/۵ برای گیاه قابل استفاده نیست و عملکرد گیاه در مقایسه با شرایط بهینه و استفاده از فسفات محلول، پایین‌تر مشاهده شده است (Vassilev *et al.*, 2001; Rajan *et al.*, 1996). با وجود این، نتایج تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف نشان داده است که می‌توان با اعمال تدابیر و روش‌های علمی، قابلیت جذب فسفر را در این ماده افزایش داد (Malakooti, 1998). استفاده از میکروارگانیسم‌های خاکزی که توانایی انحلال فسفات‌ها و تبدیل آن به فسفر محلول را دارند،

برای تعیین کیفی توانایی انحلال میکروارگانسیم‌های حل‌کننده فسفات در محیط NBRIP، پس از ۷ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی رشد یافته و همچنین قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفر که در اطراف کلنی تشکیل شده بود اندازه‌گیری شد و میزان شاخص حلالیت (Solubilization index (SI) از فرمول زیر تعیین گردید (Edi-Premono *et al.*, 1996) (فرمول ۱):

$$\text{فرمول ۱} \quad \frac{\text{قطر هاله شفاف} + \text{قطر کلنی}}{\text{قطر کلنی}}$$

تعیین کمی توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول در محیط NBRIP مایع

سویه‌های انتخاب شده از محیط جامد که شاخص حلالیت بالایی داشتند، در محیط کشت مایع NBRIP کشت گردیدند. برای این منظور تعداد ۱۲ ارلن حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع NBRIP تهیه و باکتری‌ها و قارچ‌ها در این محیط تلقیح شدند و بعد از ۲۴ ساعت شیک کردن، مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی و قارچی در ارلن‌های حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع NBRIP با دو منبع خاک فسفات (سنگ فسفات یاسوج) و تری‌کلسیم فسفات ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) و هر کدام به مقدار ۵ گرم در لیتر و در سه تکرار تلقیح گردیدند. همزمان یک نمونه شاهد در سه تکرار با هر دو منبع فسفات بطور جداگانه، آماده شد. ارلن‌های حاوی محیط تلقیح شده و شاهد در شیکر انکوباتور در تاریکی و با سرعت ۶۰ rpm (دور در دقیقه) و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بعد از انکوباسیون در زمان‌های صفر، ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روز، از سوسپانسیون‌های حاصل مقدار ۲۰ میلی‌لیتر برداشته و در دور ۳۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوسپانسیون‌ها با کاغذ صافی واتمن صاف گردیده و برای اندازه‌گیری فسفر محلول و pH عصاره آماده شدند و مقادیر pH با pH متر و فسفر محلول با روش مولیبدات-وانادات و با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردیدند (Cotteni, 1980).

(*et al.*, 2000). تولید این اسیدهای آلی بوسیله باکتری‌های حل‌کننده فسفات متعلق به جنس‌های سودوموناس، ریزوبیوم، اروینیا و بورخولدریا گزارش شده است (Dalal *et al.*, 1977). سازوکار اثر قارچ‌ها برای حلالیت فسفر نیز با اسیدی کردن محیط می‌باشد که یا از طریق ترشح پروتون با جذب آمونیوم (Reyes *et al.*, 1999) و یا از طریق تولید اسیدهای آلی انجام می‌گیرد (Cunningham & Kuyack, 1992). معمولاً در محیط کشت‌های مایع و جامد، فعالیت حل‌کنندگی قارچ‌ها به علت تولید اسیدهای آلی زیاد نسبت به باکتری‌ها، بیشتر می‌باشد (Venkateswarlu *et al.*, 1984). بنابراین استفاده از میکروارگانسیم‌های بومی با کارایی بالا برای تولید مایه تلقیح و استفاده از منابع معدنی کم محلول و نامحلول فسفات یکی از راه‌کارهای مهم جهت نیل به کشاورزی پایدار و حفظ محیط زیست می‌باشد. لذا این تحقیق با هدف بررسی کارایی میکروارگانسیم‌های ریزوسفری در انحلال تری‌کلسیم فسفات و خاک فسفات در شرایط آزمایشگاهی مورد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی میکروارگانسیم‌های حل‌کننده فسفات از ریزوسفر گندم

تعداد ۵۵ نمونه مرکب خاک ریزوسفری در فصل بهار در مرحله پنجه‌دهی گندم از مزارع بخش غربی و شمالی شهرستان ارومیه تهیه گردید. بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، بلافاصله مراحل جداسازی میکروارگانسیم‌های حل‌کننده فسفات انجام گرفت. برای این منظور نمونه‌های خاک به روش رقت‌های ده‌تایی با آب مقطر استریل تا 10^{-5} رقیق شدند. برای جداسازی میکروارگانسیم‌های حل‌کننده فسفات از محیط کشت جامد NBRIP^۱ (موسسه ملی تحقیقات گیاهی هند) استفاده شد. ترکیبات این محیط برحسب گرم در لیتر شامل Agar (۱۵)، Glucose (۱۰)، $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (۵)، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (۲/۵)، $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۵)، KCl (۰/۲) و $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (۰/۱) بودند (Nautiyal *et al.*, 1999).

آزمون کیفی توان انحلال فسفات معدنی

1- National Botanical Research Institutes Phosphate

طرح آزمایشی و تجزیه‌های آماری

این پژوهش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. سه فاکتور مورد استفاده شامل منبع فسفات در دو سطح (تری‌کلسیم فسفات و خاک فسفات)، میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات در دوازده سطح (شاهد، PSB₄₅، PSB₁₅، PSB₃₀، PSB₂، PSB₋، PSF₁₁، PSB₁₂، PSB₂₀، PSF₁، PSF₃، PSF₄ و PSF₇) و هفت سطح زمان انکوباسیون (۰، ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روز) بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج و بحث

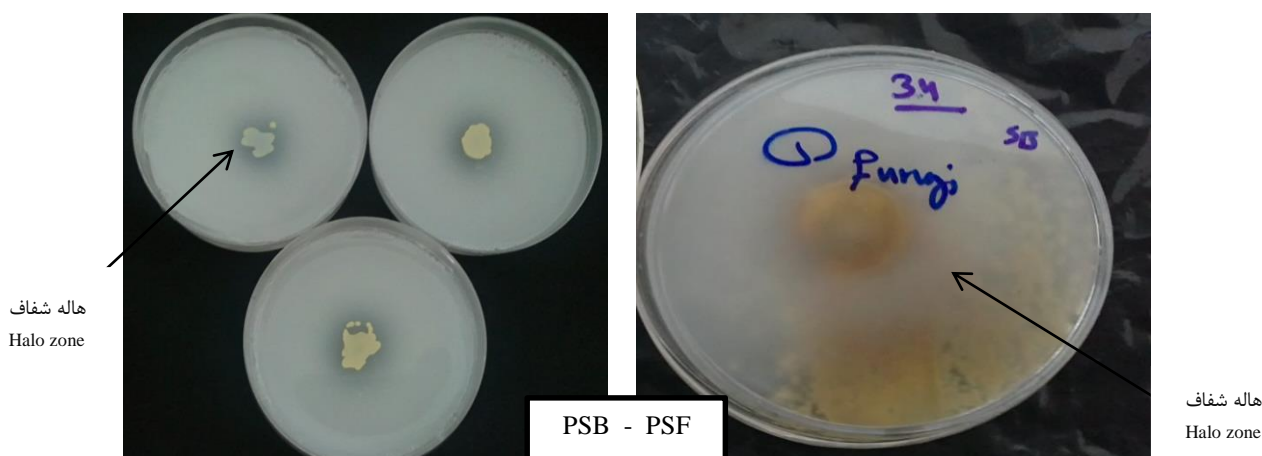
جداسازی میکروارگانیسم‌ها و میزان شاخص حلالیت

سویه‌ها

از ۵۵ نمونه خاک مرکب ریزوسفری، تعداد ۵۰ جدایه منتسب به باکتری‌ها و ۲۰ جدایه مربوط به قارچ‌های حل‌کننده فسفات جداسازی گردیدند. غربالگری و جداسازی میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات با استفاده

از محیط NBRIP و ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها صورت گرفت (شکل ۱).

در بررسی توانایی کیفی انحلال فسفات نامحلول نتایج شاخص حلالیت (SI) در ۴۰ سویه کارا که از نظر شکل کلنی و نوع خاک متفاوت بودند، در جدول ۱ آورده شده است. در طول ۷ روز انکوباسیون مشاهده شد که با افزایش قطر کلنی، قطر منطقه‌ی شفاف دور کلنی نیز افزایش یافت. نتایج نشان داد که از بین سویه‌های میکروبی حل‌کننده فسفر، سویه‌های PSB₁₅، PSB₄₅، PSB₃₀، PSB₂، PSB₁₁، PSB₁₂، PSB₂₀، PSF₁، PSF₃، PSF₄ و PSF₇ از شاخص حلالیت بالایی برخوردار بودند. در بین سویه‌های جداسازی شده، سویه‌هایی نیز مشاهده شدند که سرعت رشد کلنی آن‌ها بسیار بالا بود. به طوری که قطر هاله و کلنی آن‌ها برابر بود و شاخص حلالیت برای آن‌ها یک در نظر گرفته شد. در پژوهشی شانکرو (Shankarrao, 2012) گزارش کرد که شاخص حلالیت در برخی سویه‌های باکتری با افزایش زمان انکوباسیون (از یک تا هفت روز) افزایش یافت. همچنین در پژوهشی مان چنگ و همکاران (Meunchang et al., 2006) ۱۶۸ باکتری ریزوسفری را جداسازی و از نظر توانایی حل فسفات‌های نامحلول مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که ۶۲ سویه (۱۳۷ درصد) قادر به حل فسفر بودند.



شکل ۱- نمایی از هاله‌ی شفاف تشکیل شده توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات

Fig.1. Bacterial colony exhibiting halo zone of P solubilization

PSB = باکتری‌های حل‌کننده فسفات، PSF = قارچ‌های حل‌کننده فسفات

جدول ۱- شاخص حلالیت (SI) سویه‌های میکروبی حل‌کننده فسفات پس از ۷ روز انکوباسیون

Table 1: Solubilization index of microbial isolates of phosphate solubilizing after seven days incubation

نام سویه Strain name	شاخص حلالیت Solubilization index	نام سویه Strain name	شاخص حلالیت Solubilization index
PSB ₁	1.12	PSB ₃₄	1.80
PSB ₂	2.35	PSB ₃₅	1.80
PSB ₃	2.00	PSB ₃₉	2.00
PSB ₅	2.20	PSB ₄₁	1.90
PSB ₆	2.20	PSB ₄₂	1.86
PSB ₇	1.75	PSB ₄₃	1.92
PSB ₈	2.10	PSB ₄₅	2.90
PSB ₁₀	1.60	PSB ₄₆	1.12
PSB ₁₁	2.40	PSB ₄₈	1.60
PSB ₁₂	2.60	PSB ₅₀	2.00
PSB ₁₄	1.60	PSB ₅₁	1.90
PSB ₁₅	2.75	PSB ₅₃	1.60
PSB ₁₆	1.80	PSF ₁	5.40
PSB ₁₉	2.00	PSF ₂	1.20
PSB ₂₀	2.80	PSF ₃	5.10
PSB ₂₂	1.60	PSF ₄	2.00
PSB ₂₃	2.00	PSF ₅	1.60
PSB ₂₆	1.60	PSF ₆	1.20
PSB ₂₈	2.15	PSF ₇	1.90
PSB ₃₀	2.80	PSF ₈	1.80

PSB و PSF به ترتیب نشان‌دهنده‌ی باکتری‌های حل‌کننده فسفات و قارچ‌های حل‌کننده فسفات

PSB and PSF show phosphate solubilizing bacteria and phosphate solubilizing fungi respectively

ارزیابی کمی پتانسیل انحلال فسفات‌های نامحلول

میزان فسفر حل‌شده و pH

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی منبع فسفات، میکروارگانیسم، زمان انکوباسیون و همچنین اثرات متقابل دوگانه (منبع فسفات × میکروارگانیسم، منبع فسفات × زمان انکوباسیون و میکروارگانیسم × زمان انکوباسیون) و سه‌گانه منبع فسفات و میکروارگانیسم و زمان انکوباسیون، در میزان فسفر آزاد شده و pH محیط، در سطح احتمال ۰/۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

براساس مقایسه میانگین داده‌ها، تلقیح میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات به طور متوسط در هر دو شکل منبع فسفات، مقدار فسفر آزاد شده بیشتری (۲۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح) (۳۳/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) داشت. اما میزان فسفر انحلال یافته در منبع تری‌کلسیم فسفات (۳۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) حدود ۱۳ برابر بیشتر از منبع خاک فسفات (۲۶/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. بالا بودن میزان آزاد

سازی فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات نسبت به خاک فسفات احتمالاً به دلیل پایین بودن حلالیت خاک فسفات نسبت به تری‌کلسیم فسفات باشد زیرا نوع فسفات در کانسارهای خاک فسفات آپاتیت می‌باشد (Malakooti & Riazi Hamadani, 1990). همچنین میکروارگانیسم‌ها شکل غیرقابل استفاده و نامحلول تری‌کلسیم فسفات ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) را به شکل‌های قابل استفاده H_2PO_4^- و HPO_4^{2-} تبدیل می‌کنند (Turan *et al.*, 2009). همان‌طور که مشاهده گردید (جدول ۳)، سویه‌های PSF₁ و PSF₃ به ترتیب با انحلال ۶۳۶ و ۶۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منبع تری‌کلسیم فسفات و ۷۰/۶ و ۵۷/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منبع خاک فسفات، بیشترین توان انحلال را نسبت به سایر سویه‌ها و تیمار شاهد داشتند. قارچ‌های حل‌کننده فسفات از سازوکارهای متفاوتی برای انحلال ترکیبات فسفر در خاک استفاده می‌کنند که برای نمونه می‌توان از اسیدی شدن و کلاته شدن و یا تولید فیتوهورمون‌هایی مثل اسید ایندول استیک (IAA) نام برد (Whitelaw, 1999; Mehnaz &

Lazarovits, 2006). در پژوهشی کنگ و همکاران (Kang *et al.*, 2008) بیان داشتند که آسپرژیلوس‌ها با تولید اسید سیتریک و کاهش pH نقش تاثیرگذاری در انحلال شکل‌های فسفات نامحلول دارند.

جدول ۲- تجزیه واریانس فسفر آزاد شده و pH توسط سویه‌ها
Table 2: Variance analysis of released P and pH by strains

منابع تغییرات	Source of variation	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)	pH
		df	P solubilization	
منبع فسفات (P)	phosphate sources(P)	1	12996679***	127***
میکروارگانیسم (M)	Microorganisms(M)	11	444727***	21.9***
زمان انکوباسیون (T)	incubation times(T)	6	601422***	66.9***
منبع فسفات×میکروارگانیسم	M*P	11	324211***	3.72***
منبع فسفات×زمان انکوباسیون	T*P	6	416234***	3.12***
میکروارگانیسم×زمان انکوباسیون	T*M	66	36151***	1.70***
اثر متقابل سه‌گانه (T*M*P)	T*M*P	66	325899***	0.522***
خطا	Error	286	42.5	0.042
ضریب تغییرات (%)	Coefficient of Variation	-	3.50	3.80

*** معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد

*** significant difference at 0.1%

جدول ۳- اثر متقابل منبع فسفات و سویه‌های میکروبی بر میزان فسفر آزاد شده
Table 3: The interaction effect of phosphate source and microbial strains on released P

سویه‌ها (strai)												منبع فسفات (source)
PSF ₇	PSF ₄	PSF ₃	PSF ₁	PSB ₂₀	PSB ₁₂	PSB ₁₁	PSB ₂	PSB ₃₀	PSB ₁₅	PSB ₄₅	Control	(source)
144	91.9	634	636	428	264	381	329	412	513	286	63.5	TCP
11.0	8.20	62.1	39.2	40.6	15.4	40.8	13.6	32.0	23.2	30.5	4.30	RP

LSD = 7.86

فسفات آزاد شده و کاهش pH احراز نشد، ولی کاهش pH محیط با همه‌ی منابع فسفر مشاهده گردید (Reddy *et al.*, 2002; Ahmad & Jha, 1968; Narsian & Patel, 2000). همچنین باکتری‌ها با تولید اسیدهای آلی pH محیط را کاهش داده و سبب انحلال فسفات‌های نامحلول می‌شوند. کاهش pH بطور معنی‌داری سبب آزادسازی فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات شد (Alikhani *et al.*, 2006). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با کاهش pH، سویه‌های میکروبی میزان فسفر بیشتری را به فاز محلول آزاد می‌کنند (Turan *et al.*, 2009).

همچنین مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن بود که تلقیح سویه‌های مختلف میکروبی، در هر دو منبع خاک‌فسفات و تری‌کلسیم فسفات pH محیط را کاهش داد، در حالی‌که در تیمار شاهد تغییر قابل توجهی در pH مشاهده نشد. بیشترین کاهش pH (حدود ۴ واحد) مربوط به سویه‌ی PSF₁ از منبع تری‌کلسیم فسفات و کمترین میزان کاهش pH مربوط به تیمار شاهد از منبع خاک فسفات بود (جدول ۴). احتمالاً تولید اسیدهای آلی توسط سویه‌های میکروبی سبب کاهش pH محیط شده و براساس مطالعات برخی محققان هرچند که رابطه‌ی معنی‌داری بین مقدار

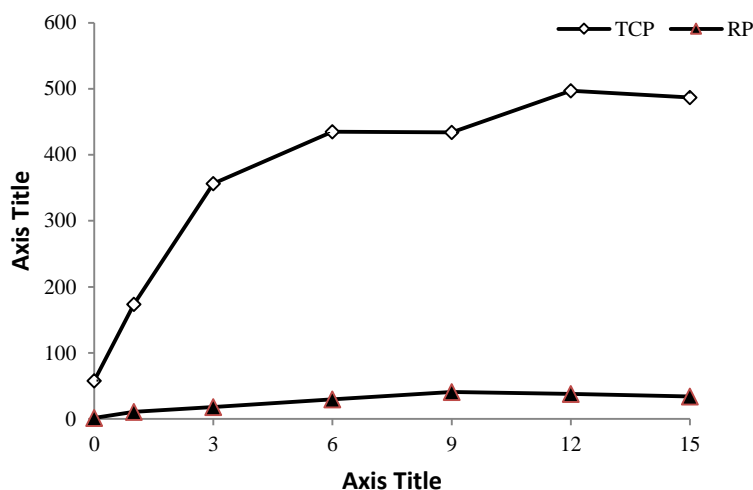
جدول ۴- اثر متقابل منبع فسفات و سویه‌های میکروبی بر میزان pH
Table 4: The interaction effect of phosphate source and microbial strains on pH

(strain) سویه‌ها												منبع فسفات phosphate) (source
PSF ₇	PSF ₄	PSF ₃	PSF ₁	PSB ₂₀	PSB ₁₂	PSB ₁₁	PSB ₂	PSB ₃₀	PSB ₁₅	PSB ₄₅	Control	
4.90	5.00	3.90	3.50	4.90	5.00	4.40	4.20	4.80	4.90	5.00	5.89	TCP
6.50	6.30	4.30	4.50	5.90	6.40	5.60	6.10	5.00	5.00	5.30	7.50	RP

LSD = 0.777

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد با افزایش زمان انکوباسیون، میزان آزاد سازی فسفر از هر دو منبع فسفات افزایش یافت و بطور متوسط در زمان ۱۲ روز بیشترین مقدار فسفر محلول (۲۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان فسفر آزاد شده (۴۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مربوط به منبع تری کلسیم فسفات در زمان ۱۲ روز و کمترین مقدار آن (۱/۳۸ میکروگرم بر

میلی‌لیتر) مربوط به خاک فسفات در زمان صفر انکوباسیون بود (شکل ۲). براساس شکل ۳ کمترین مقدار pH مربوط به زمان ۱۲ روز (pH=۳/۹۰) از منبع تری کلسیم فسفات و بیشترین مقدار pH (pH=۷/۷۰) مربوط به منبع خاک فسفات و زمان صفر بود. بنابراین با افزایش زمان انکوباسیون میزان فسفر آزاد شده از منابع نامحلول فسفات افزایش یافته و مقدار pH روند نزولی داشت.



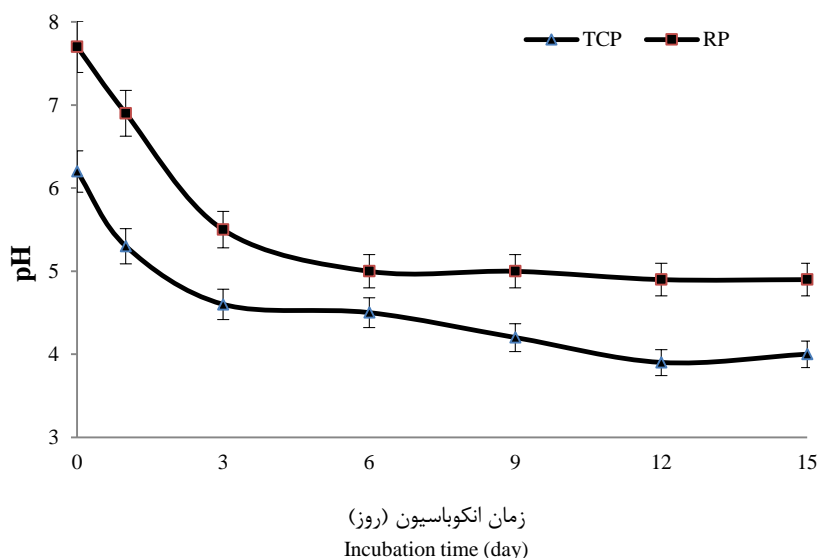
شکل ۲- اثر متقابل سطوح منبع فسفات و زمان انکوباسیون بر میزان فسفر آزاد شده

(سنگ فسفات) RP (تری کلسیم فسفات)، TCP

Fig.2. The interaction effect of phosphate source and incubation time on released P
TCP (Tricalcium phosphate), RP (Rock phosphate)

طبق نتایج حاصله، با افزایش زمان انکوباسیون، میزان pH در همه‌ی سویه‌های میکروبی کاهش یافت و کمترین میزان pH در روز دوازدهم (pH = ۲/۴) توسط سویه‌ی PSF₁ مشاهده شد در حالی که میزان pH در تیمار شاهد بدون تغییر بود (جدول ۶).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش زمان انکوباسیون به مراتب میزان انحلال فسفات‌های نامحلول توسط سویه‌های میکروبی افزایش یافت. به طوری که بیشترین میزان فسفر آزاد شده مربوط به سویه‌ی PSF₁ در زمان ۱۲ روز (۵۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود و کمترین میزان انحلال در زمان صفر و از تیمار شاهد (۲۸/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد (جدول ۵).



شکل ۳- اثر متقابل سطوح منبع فسفات و زمان انکوباسیون بر میزان pH (سنگ فسفات) RP (تری کلسیم فسفات)، TCP

Fig.3. The interaction effect of phosphate source and incubation time on pH
TCP (Tricalcium phosphate), RP (Rock phosphate)

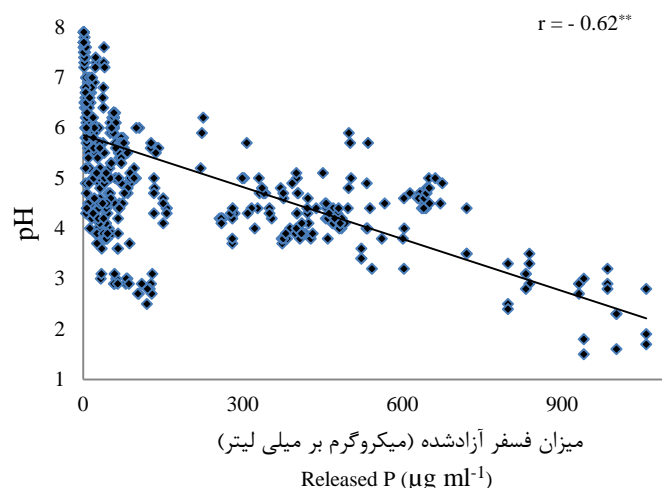
بین میزان فسفر حل‌شده و کاهش pH ارائه شده است (Gupta *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2011; Keneni *et al.*, 2010). در پژوهشی وایاس و گالاتی (Vyas & Gulati, 2009) گزارش کردند که بیشترین کاهش در میزان pH همبستگی مثبتی با بالاترین میزان فسفر انحلال یافته دارد. میتال و همکاران (Mittal *et al.*, 2008) همچنین اظهار داشتند که مقادیر آزاد سازی فسفر محلول با میزان تولید اسید همبستگی مثبتی دارد.

یافته‌ها نشان داد که میزان انحلال فسفات نامحلول در محیط تلقیح شده با سودوموناس در روز ۱۲ بیشترین مقدار را داشت و کمترین مقدار pH نیز در روز ۸ مشاهده شد در حالی که میزان فسفر حل‌شده و pH در تیمار شاهد بدون تغییر بود (Kannapiran & Ramkumar, 2011). مقایسه همبستگی بین فسفر آزاد شده و pH نشان داد که بین میزان pH و فسفر حل‌شده رابطه‌ی خطی منفی و معنی‌داری ($r = -0.63^{**}$) در سطح یک درصد وجود دارد (شکل ۴). گزارش‌های زیادی در مورد همبستگی معکوس

جدول ۵- اثر متقابل سویه‌های میکروبی و زمان انکوباسیون بر میزان فسفر آزادشده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 5: The interaction of microbial strains and incubation time to released P

15	12	9	6	3	1	0	زمان Time
روز پس از انکوباسیون Days after incubation							سویه‌های میکروبی Microbial strains
41.5	33.8	37.8	29.0	30.6	28.7	28.2	Control
203	224	192	192	195	71.1	29.1	PSB ₄₅
337	328	334	352	328	166	28.9	PSB ₁₅
271	244	243	342	213	213	29.2	PSB ₃₀
220	217	202	203	193	134	28.5	PSB ₂
267	256	281	252	229	160	29.2	PSB ₁₁
255	239	167	161	72.6	53.5	28.9	PSB ₁₂
301	323	302	294	269	123	29.1	PSB ₂₀
544	570	500	416	265	37.0	29.5	PSF ₁
529	555	469	451	364	38.8	29.4	PSF ₃
81.1	69.2	37.1	50.0	39.5	38.7	28.7	PSF ₄
139	149	81.2	51.4	46.8	41.1	28.0	PSF ₇
10.50							LSD _{0.05}



شکل ۴- همبستگی بین مقادیر فسفر آزادشده و pH
Fig.4. Correlation between released P and pH

جدول ۶- اثر متقابل سویه‌های میکروبی و زمان انکوباسیون بر میزان pH
Table 6: The interaction effect of microbial strains and incubation time on pH

15	12	9	6	3	1	0	زمان:Time
روز پس از انکوباسیون Days after incubation							سویه‌های میکروبی Microbial strains
6.60	6.80	6.70	6.60	6.90	6.90	7.00	Control
4.50	4.60	4.60	4.60	4.90	6.00	6.90	PSB ₄₅
4.10	4.40	4.40	4.50	4.70	5.90	7.00	PSB ₁₅
4.30	4.40	4.20	4.30	4.50	5.80	7.00	PSB ₃₀
4.80	5.10	4.50	4.60	4.60	5.50	6.90	PSB ₂
4.60	4.50	4.40	4.50	4.20	5.60	6.90	PSB ₁₁
4.70	4.60	5.20	5.70	6.10	6.50	7.00	PSB ₁₂
4.10	4.10	4.70	5.40	6.00	6.50	7.00	PSB ₂₀
2.60	2.40	2.60	3.00	4.10	6.30	7.00	PSF ₁
2.80	2.90	2.90	3.20	4.00	6.10	7.00	PSF ₃
5.20	5.30	5.40	5.20	5.70	6.10	7.00	PSF ₄
5.10	5.00	5.50	5.70	5.6	6.20	7.00	PSF ₇
0.320							LSD _{0.05}

نتیجه‌گیری کلی

شده گردید. با افزایش روند حلالیت فسفات‌های نامحلول، کاهش pH نیز مشاهده شد و همبستگی معکوسی بین میزان فسفر حل شده و کاهش pH وجود داشت. بنابراین انحلال فسفات‌های نامحلول توسط میکروارگانیسم‌ها را می‌توان به تولید اسیدهای آلی، تولید پروتون، ایجاد کلات، تولید آنزیم‌های فسفاتاز و غیره نسبت داد. به طور کلی می‌توان از این جدایه‌های بومی توانمند در جهت انحلال فسفات‌های نامحلول (به دلیل تثبیت فسفر که مشخصه‌ی بارز خاک‌های آهکی ایران می‌باشد)، استفاده کرد.

به‌طور کلی با توجه به نتایج این تحقیق نشان داد که با تلقیح سویه‌های کارآمد (با شاخص حلالیت بالا) به محیط مایع NBRIP، میزان حلالیت تری‌کلسیم‌فسفات و خاک‌فسفات افزایش یافت، اما میزان فسفر حل شده از منبع تری‌کلسیم‌فسفات بیشتر از خاک فسفات بود. همچنین قارچ‌ها و باکتری‌های حل‌کننده فسفات در محیط کشت مایع میزان انحلال فسفر را نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۱۰ و ۸ برابر افزایش دادند. از طرفی افزایش زمان انکوباسیون سبب افزایش میزان فسفر آزاد

References

- Abd-Elmonem, E.A., and Amberger, A. (2000). Studies on some factors affecting the solubilization of P from rock phosphate. In: *X International Colloquium for the Optimization of Plant Nutrition*, eds. Wally, Y. and Shehab, X. National Research Centre (NRC), Cairo, Egypt, pp. 6-7.
- Ahmad, N., and Jha, K. K. (1968). Solubilization of rock phosphate by micro-organisms isolated from Bihar soils. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 14(1), 89-95.
- Alikhani, H. A., Saleh-Rastin, N., and Antoun, H. (2007). Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In: *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Springer Netherlands, pp. 35-41.
- Asea, P. E. A., Kucey, R. M. N., and Stewart, J. W. B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(4), 459-464.
- Cotteni, A. (1980). Methods of Plant Analysis. In: *Soil and Plant Testing FAO Soils Bulletin*, NO 38/2, pp. 64-100.
- Cunningham, J. E., and Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1451-1458.
- Dalai, R. C. (1977). Soil organic phosphorus. *Advances in Agronomy*, 29, 83-117.
- Deubel, A., Gransee, A., and Merbach, W. (2000). Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 387-392.
- Edi-Premono, M., Moawad, A., and Vleck, P.L.G. (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11, 13-23.
- 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.
- Goenadi, D.H., Siswanto, M. and Sugiarto, Y. (2000). Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 927-932.
- Guinazu, L.B, Andres, J.A., Mfdel, P., Pistorio, M. and Rosas, S.B. (2010). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 185-190.
- Gupta, N., Sabat, J., Parida, R., and Kerkatta, D. (2007). Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. *Acta Botanica Croatica*, 66(2), 197-204.
- Jung, I., Park, D. H., and Park, K. (2002). A study of the growth condition and solubilization of phosphate from hydroxyapatite by *Pantoea agglomerans*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(4), 201-205.
- Kang, S. C., Pandey, P., Khillon, R., and Maheshwari, D. K. (2008). Process of rock phosphate solubilization by *Aspergillus* sp PS 104 in soil amended medium. *Journal of Environmental Biology*, 29(5), 743-746.
- Kannapiran, E., and Ramkuma, V. S. (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from sediments of Thondi coast, Palk Strait, Southeast Coast India. *Annals of Biological Research*, 2, 157-163.
- Keneni, A., Assefa, F., and Prabu, P. C. (2010). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean of Ethiopia and their abilities on solubilizing insoluble phosphates. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12, 79-89.
- 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.
- Malakooti, M. J. (1998). Sustainable agriculture and increase performance by optimizing the use of fertilizers in Iran. Publish Agricultural Training. Karaj, Iran, 460p. (in Persian).
- Malakooti, M. J. and Riaz Hamadani, S.A. (1990). Fertilizers and soil fertility. First Edition, The University of Tehran Press, 808p. (in Persian).

- Mehnaz, S., and Lazarovits, G. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, 51(3), 326-335.
- Meunchang, S., Thongra-Ar, P., Sanoh, S., Kaewsuralikhit, S., and Ando, S. (2006). Development of rhizobacteria as a biofertilizer for rice production. In: *International workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use*, pp. 16-20.
- Mittal, V., Singh, O., Nayyar, H., Kaur, J., and Tewari, R. (2008). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 718-727.
- Miyasaka, S. C., and Habte, M. (2001). Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(7-8), 1101-1147.
- Molla, A. H., Shamsuddin, Z. H., Halimi, M. S., Morziah, M., and Puteh, A. B. (2001). Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4), 457-463.
- Nahas, E. (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganism isolated from soil. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 12(6), 18-23.
- Narsian, V., and Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4), 559-565.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., Guimaraes, C., Schaffert, R.E. and Sa, N. M. H. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1782-1787.
- Rajan SSS, Watkinson JH and Sinclair AG 1996. Phosphate rocks for direct application to soil. *Advance in Agronomy*, 57, 77-14.
- Rajan, S. S. S., Watkinson, J. H., and Sinclair, A. G. (1996). Phosphate rocks for direct application to soils. *Advances in Agronomy*, 57, 77-159.
- Rasipoor, L. and Aliasgharzad, N. (2005). Interaction of phosphate solubilizing bacteria and *Bradyrhizobium japonicum* on yield and nutrient uptake by Soybean. *Agriculture Science*, 15, 141-156, (In Persian).
- Reddy, M. S., Kumar, S., Babita, K., and Reddy, M. S. (2002). Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 84(2), 187-189.
- Rejali, f., Asadi, H., Khavazi, k., Asgharzadeh, A., and Afshari, M. (2010). The status of biological phosphate fertilizers and the necessity of its development in Iranian agricultural. *The 1st Iranian Fertilizer Challenges Congress: Half a Century of the Fertilizer Consumption*. 1-3 March, Tehran, Iran, (in Persian).
- Reyes I, Bernier L, Simard R, Tanguay P. H and Antoun H. 1999. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 291-295.
- Rodriguez, H., and Frage, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339.
- Shankarrao, O. (2012). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizospheric Soil Samples. *International Interdisciplinary Research Journal*, 2(4), 28-29.
- Sharma, S., Kumar, V., and Tripathi, R. B. (2011). Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal Microbial Biotechnology Research*, 1(2), 90-95.
- Sharma, K. (2005). Isolation, Purification and Identification of Bacteria. In: *Manual of Microbiology*, Ane Books Publication, New Delhi, 41p.
- Turan, M., Ataoglu, N., and Sahan, F. (2006). Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. *Journal of Sustainable Agriculture*, 28(3), 99-108.

- Vance, C. P., Uhde- Stone, C., and Allan, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3), 423-447.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Fenice, M., and Federici, F. (2001). Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresource Technology*, 79(3), 263-271.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortes, A., and Bashan, Y. (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5-6), 460-468.
- Vyas, P., and Gulati, A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, 9(1), 1.
- Venkateswarlu, B., Rao, A. V., and Raina, P. (1984). Evaluation of phosphorus solubilisation by microorganisms isolated from Aridisols. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 32(2), 273-277.
- Whitelaw, M. A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, 99-151.
- Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., and Mao, C. (2011). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils*, 47(4), 437-446.

Isolation of phosphate-solubilizing microorganisms from wheat rhizosphere and evaluation of the their solubilizing potential in presence of two insoluble phosphate sources

Razieh Ebrahimi Karimabad¹, MirHassan Rasouli-Sadaghiani^{2*}, Mohsen Barin³

(Received: April 2015

Accepted: March 2016)

Abstract

Phosphorus (P) is one of nutrient elements for plant growth. In most soils P has complex behavior and forms sparingly soluble and insoluble compounds with soil particles. Phosphorus bioavailability can be controlled by soil biological activities for optimum nutrition of plants. This study was carried out in order to isolation of P-solubilizing bacteria (PSB) as well as P-solubilizing fungi (PSF) and their screening in terms of P solubilizing potential in presence of tricalcium phosphate (TCP) and rock phosphate (RP). A total of 55 soil samples were taken from the wheat rhizosphere of Urmia region, and the isolation as well as qualitative solubilizing potential was done in solid NBRIP media. Quantitative P-dissolution ability of isolated strains were assessed in a factorial experiment based on completely randomized design including phosphate sources (RP and TCP) and selected microbial isolates at incubation condition at 28 degrees Celsius. The studied strains included control, PSB₄₅, PSB₁₅, PSB₃₀, PSB₂, PSB₁₁, PSB₁₂, PSB₂₀, PSF₁, PSF₃, PSF₄ and PSF₇ and sampling were done at seven incubation times (0, 1, 3, 6, 9, 12 and 15 days). The results showed that P solubilization and pH of medium significantly ($P < 0.001$) influenced by insoluble phosphate sources, microbial isolates and incubation time. So that the maximum release of soluble P ($636 \mu\text{g ml}^{-1}$) was observed by strain PSF₁ from TCP source. Furthermore, the PSF₁ strain on day-12 showed the highest solubilized P ($570 \mu\text{g ml}^{-1}$) compared to other strains. Significant negative correlation was observed between medium pH and dissolved. The pH levels in treatment inoculated with strain PSF₁ on TCP (approximately 4 units) showed the highest pH decrement compared to other strains and control media. Highest decline of pH was observed in day-12 ($\text{pH} = 3.90$) by the same strain, while the pH in the control treatments unvaried.

Keywords: Bacteria, Fungi, Phosphorus, Soil, Solubilization index,

1- Graduate of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

2- Associate Prof. of Soil Science, Dept. of Soil Science, Urmia University

3-Assistant Prof. of Soil Science, Dept. of Soil Science, Urmia University

* Corresponding author E-mail: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir