جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده روی و بررسی کارایی چند حامل بر زنده‌مانی جدایه برتر

فاطمه هاشم نژاد[۱]، محسن برین[۲*]، مریم خضری[۳]، یوبرت قوستا[۴]

(تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۷/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۶)

چکیده

روی یکی از عناصر کم‌مصرف است که در خاک‌های آهکی عمدتا به شکل‌های کم‌محلولی وجود داشته که برای گیاه قابل استفاده نمی‌باشد. یکی از راه‌های تأمین روی مورد نیاز گیاه در این شرایط، استفاده از میکروارگانیسم‌ها در قالب کود زیستی است که موجب افزایش حلالیت ترکیبات نامحلول روی در خاک می‌شوند. برای عرضه این کودها نیاز به حامل‌های مختلفی جهت زنده‌مانی و ماندگاری میکروارگانیسم‌ها است. لذا، این تحقیق با هدف ارزیابی تأثیر باکتری‌های حل کننده ترکیبات نامحلول روی جداسازی شده از خاک‌های شور و بررسی زنده‌مانی سویه برتر در حامل‌های مختلف به مدت نه ماه در قالب طرح پایه کاملا تصادفی دو فاکتوره (حامل و زمان) با سه تکرار اجرا گردید. حامل‌های جامد، شامل پرلیت، پیت ماس، خاک اره، تفاله چغندرقند، کود دامی، ورمی‌کمپوست، آزولا، بیوچار (آزولا و سیب)، سبوس و تالک بودند. در این تحقیق، زادمایه‌های باکتری‌یایی تهیه شده با جمعیت اولیه یکسان پس از نگهداری در دمای اتاق از نظر توان زنده‌مانی باکتری مورد مقایسه قرار گرفتند. برای شمارش باکتری‌های زنده در حامل‌های میکروبی، در هر ماه بعد از تهیه سری‌های رقت از روش شمارش MPN استفاده شد. نتایج نشان داد که از ۲۴ نمونه خاک ریزوسفری، تعداد ۱۵ سویه باکتری حل‌کننده روی جداسازی و خالص‌سازی شد. پنج جدایه‌ی برتر از لحاظ انحلال ترکیب نامحلول روی انتخاب شده و جهت شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس توالی ژن 16S rRNA، سه جدایه به جنس *سودوموناس* و دو جدایه به *انتروباکتر* تعلق داشتند. از بین باکتری‌های شناسایی شده باکتری *سودوموناس فلورسنس* (*Pseudomonas fluorescens*) توان کمی (۷۵/۱۶) و توان کیفی (۲/۲۸) بالایی داشت که قادر به انحلال تمام ترکیبات نامحلول روی بود. نتایج حاصل از شمارش باکتری‌ها در حامل‌ها نشان داد که از میان حامل‌های مورد آزمایش، بیشترین لگاریتم جمعیت شمارش شده بعد از گذشت نه ماه در حامل بیوچار سیب ($5/07$ cfu g^{-1}) و بیوجار آزولا ($5/07$ cfu g^{-1}) و کمترین جمعیت شمارش شده در حامل تالک ($2/11$ cfu g^{-1}) به دست آمد. بطور کلی می توان بیان داشت که از بین حامل‌های مورد آزمایش، بیوچار بعلت ویژگی‌های خوب و مقرون به‌صرفه بودن از نظر اقتصادی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: حامل جامد، زنده‌مانی، کود زیستی، *Pseudomonas fluorescens*

هاشم نژاد، ف.، برین، م.، مریم خضری، م.، یوبرت قوستا، ی. ۱۴۰۲. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده روی و بررسی کارایی چند حامل بر زنده‌مانی جدایه برتر. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۱۱، شماره ۱. صفحه: ۱۶-۲۹.

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۲-دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۳-استادیار موسسه تحقیقات حفظ نبات، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۴- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

* پست الکترونیک: m.barin@urmia.ac.ir

مقدمه

کمبود عناصر کم‌مصرف به‌ویژه روی یکی از مشکلات عمده بخش کشاورزی در سرتاسر جهان است که اغلب در خاک‌های آهکی رخ می‌دهد و این خاک‌ها بیش از ۳۰ درصد سطح زمین را پوشانده است. اغلب خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک ایران نیز آهکی است که آهک منجر به کمبود عناصر غذایی می‌شود (Vahedi & Rasoili-Sadaghiani, 2020). از آنجایی که روی نقش‌های مختلفی شامل؛ جزء ساختاری پروتئین‌ها، کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌ها (Broadley *et al.*, 2007; Andreini *et al.*, 2009)، متابولیسم سلول‌ها، رشد و نمو و عملکرد گیاهان دارد (Shaikh & Saraf, 2017). معمولا کمبود روی در گیاهان در هر دو شرایط اسیدی و خاک‌های آبشویی یافته با مقدار روی پایین یا در خاک‌های آهکی با روی غیرقابل جذب گیاهی مشاهده می‌شود. لذا سوءتغذیه انسان ناشی از کمبود روی یک عارضه مهم تغذیه‌ای در دنیا است (Myers *et al.*, 2015). علاوه بر این مشکلات اقتصادی و زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه و نامتعادل کودهای شیمیایی سبب شده که ضرورت حرکت کشاورزی پایدار به سمت استفاده از کودهای زیستی مطرح گردد (Leach & Mumford, 2008). بنابراین از جمله راهکارهای تأمین مقدار روی مورد نیاز گیاه، استفاده از پتانسیل میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها در قالب کود زیستی است که موجب افزایش حلالیت ترکیبات کم‌محلول روی در خاک شوند. به موادی که حاوی یک یا چند میکروارگانیسم با جمعیت مناسب، به همراه مواد نگهدارنده یا متابولیت‌های تولیدی آن‌ها، کود زیستی اطلاق می‌شود (Egamberdiyeva *et al.*, 2004). کودهای زیستی به عنوان یک مولفه مهم، حاوی سلول-های زنده بوده (Vessey, 2003) که توانایی تبدیل عناصر غذایی اصلی را از فرم غیر قابل دسترس به فرم قابل دسترس، طی فرایندهای بیولوژیکی داشته (Vessey, 2003) و منجر به توسعه سیستم ریشه ای و جوانه زنی بهتر بذور می‌گردند (Chen, 2006). موفقیت در تولید صنعتی یک کود زیستی علاوه بر انتخاب بهترین سویه، مستلزم داشتن حامل مناسب، امکان تولید انبوه، فرمولاسیون مناسب همراه با بسته بندی و بازاریابی مناسب می‌باشد. همچنین مشکلی که در زمینه استفاده تجارتی و صنعتی از اکثر باکتری‌ها وجود دارد، فقدان اسپور و عدم وجود ماندگاری مایه تلقیح‌های تولیدی این گروه از کودهای زیستی می‌باشد. برای اینکه این گروه از باکتری‌ها که فاقد اسپور می‌باشند بتوانند با موفقیت در کشاورزی مورد استفاده قرار گیرند لازم است که فرمولاسیون مناسبی از آن‌ها تهیه گردد که قدرت ماندگاری حداقل ۲۴-۶ ماه را داشته باشند (Xavier & Holloway Leggett, 2004). مهم‌ترین ویژگی یک حامل توانایی حفظ جمعیت مناسبی از باکتری در فاصله زمانی تولید تا مصرف آن در مزرعه می‌باشد. یک حامل میکروبی مناسب باید دارای ویژگی‌های لازم برای حمایت از سلول‌های زنده در شرایط فیزیولوژیکی مطلوب در یک بازه زمانی مناسب باشد و همچنین اثرات جانبی منفی بر باکتری‌ها نداشته باشد (Stephens & Rask, 2000). یک حامل خوب باید دارای خصوصیاتی مانند ظرفیت نگهداری رطوبت مناسب، سهولت آزادسازی باکتری در خاک، سطح تماس یا چسبندگی کافی و استاندارد با بذر، شرایط تهویه‌ای مناسب، فاقد حالت خمیری، عدم سمیت برای سویه باکتری، گیاه و خاک، مقرون به‌صرفه بودن از نظر اقتصادی، تخلخل مناسب، سطح ویژه بالا، pH خنثی یا قابل تنظیم، یکنواختی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، امکان تولید انبوه و فرموله‌شدن آن به صورت پودر و گرانوله باشد (Somasegaran, 1994; Motsara *et al.*, 1995). حامل‌های باکتری به صورت جامد یا مایع می‌باشد که هر یک دارای مزایا و معایبی هستند. با توجه به اینکه حمل و نقل و استفاده از باکتری‌های تکثیر شده به شکل مایع دشوار است، باکتری‌ها را روی یک سری حامل جامد قرار می‌دهند. حامل‌های جامد بهتر از حامل‌های مایع نقش محافظت کننده‌گی دارد. به بیان دیگر حامل‌های جامد قادر به نگهداری بهتر باکتری‌ها پس از تلقیح بذر و کاشت آن‌ها در خاک است.. همچنین حامل‌های مایع در کوتاه‌ترین زمان ممکن باید به مصرف برسند. زیرا به فاصله کوتاهی از زمان تولید این نوع حامل‌ها، تراکم و جمعیت باکتری‌های زنده به مرور زمان کاهش می‌یابد. این در حالی است که کشت‌های جامد به مدت طولانی‌تر قابل نگهداری است. طیف وسیعی از مواد آلی و معدنی مختلفی در ایران و سایر کشورها به‌عنوان حامل‌های جامد مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. در بسیاری از کشورهای پیشرفته مانند آمریکا، کانادا، روسیه و استرالیا از پیت به عنوان حامل استفاده می‌شود که متأسفانه در ایران معادن قابل

بهره‌برداری ندارد (Khavarzi & Rajali, 2000). هر چند پیت در درجه اول، به دلیل نتایج موفقیت‌آمیز به دست آمده از کشت تجاری محبوبیت بسیاری داشت اما مشکلاتی نیز داشت. از جمله تنوع در کیفیت که وابسته به منبع تهیه آن بود. همچنین در فرآیند استریل کردن با بخار آب (اتوکلاو) که برخی ترکیبات سمی برای باکتری آزاد می‌شد (Chao & Alexander, 1984). از طرف دیگر، دسترسی آن در بسیاری از کشورها محدود است. برخی از انواع پیت‌ها می‌توانند حتی رشد گیاه را کاهش دهند (Huber *et al.*, 1989). همچنین آن‌ها اغلب مستعد آلودگی هستند که می‌توانند عمر مفید باکتری را کاهش دهند (Fages, 1992). بیشتر ذخایر پیت، pH پایین دارند که باید از آهک برای رسیدن به pH به ۷-۶/۵ استفاده شود(Ghasemi Piranloo *et al.*, 2019). تنوع زیاد در کیفیت و ترکیب حامل‌های مختلف با پیت تا حد زیادی کیفیت محصول نهایی زادمایه تولیدی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث مشکلاتی در جمعیت باکتری و شرایط ذخیره‌سازی گردیده (Van Elsas & Heijnen, 1990) و پاسخ‌های گوناگونی از اثربخشی آن‌ها مشاهده شده است (Bashan, 1998). لذا پیت تنها ترکیب مناسب برای نگهداری باکتری‌ها نیست و بنابر آزمایش‌های مختلف می‌توان از ترکیبات و منابع دیگری به جای آن استفاده نمود. ورمی‌کولیت، خاک اره، پرلیت، شلتوک برنج (Bonnier, 1960) و سنگ معدن فسفات مخلوط با کمپوست بقایای گیاهی قهوه (Date, 1988) بقایای صنایع چوب پنبه (Ferreira, 2005)، لجن بیوگاز (Mukhtar *et al.*, 2017) و ورمی کمپوست (Shariati *et al.*, 2013) مورد مطالعه قرار گرفته‌است. قاسمی پیرانلو و همکاران (Ghasemi Piranlo *et al.*, 2019) با بررسی زنده‌مانی باکتری *Enterobacter cloacae* در چند حامل جامد (پیت، باگاس، بیوچار، خاک اره، پرلیت وهیدروچار) و اثر زادمایه‌های تهیه شده بر جوانه‌زنی و رشد گندم گزارش نمودند که بیشترین جمعیت شمارش شده بعد از گذشت یک سال در حامل باگاس (10^9 cfu g^{-1}) بدست آمد. مشهدی اصغری و علی اصغرزاده (Mashhadi Asghari & Ali Asgharzadeh, 2003) جهت مقایسه کارایی چند ماده نگهدارنده باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی برای تولید مایه تلقیح یونجه، از بین حامل‌های مورد آزمایش که شامل پیت، ورمی‌کمپوست، لجن بیولوژیک پتروشیمی، ورمیکولایت+ ورمی‌کمپوست (۱:۱)، ورمیکولیت+ لجن بیولوژیک پتروشیمی (۱:۱) بود، گزارش کردند که)، ورمیکولیت+ لجن بیولوژیک پتروشیمی (۱:۱) و ورمیکولایت+ ورمی‌کمپوست (۱:۱) ضمن نگهداری باکتری به ترتیب به مدت چهار ماه و سه ماه، به عنوان حامل‌های نسبتاً مناسب برای تولید مایه تلقیح یونجه می‌باشند. لذا با توجه به نقش روی بر رشد و عملکرد بهینه گیاهان، استفاده از روش‌های سازگار با محیط‌زیست و آلایندگی کمتر زیست‌محیطی ناشی از مصرف کودهای شیمیایی، این تحقیق با هدف شناسایی باکتری‌های با توانایی حل‌کنندگی روی نامحلول و تهیه حامل مناسب جهت فرمولاسیون مناسب برای کود میکروبی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی ریزوباکتری‌های حل‌کننده ترکیبات نامحلول روی

تعداد ۲۴ نمونه خاک ریزوسفری از مزارع ذرت و گندم شهرستان ارومیه جمع‌آوری شد. بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه بلافاصله مراحل جداسازی باکتری‌های حل‌کننده روی انجام شد. پس از تهیه سریال رقت تا 10^{-4} از نمونه‌های خاک، از هر رقت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت Tris-minimal salt medium (جدول ۱) پخش گردید (Fasim, 2002). تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از ۷۲ تا ۹۶ ساعت، باکتری‌هایی که در اطراف کلنی آنها هاله شفاف که نشانه انحلال روی است، ایجاد شده بود به عنوان سویه حل‌کننده ترکیبات نامحلول روی جداسازی شدند. خالص‌سازی کلنی‌ها با کشت‌های متوالی روی محیط کشت نوترینت آگار انجام شد.

جدول ۱- محیط کشت تریس مینیمال سالت (حل کننده روی)

Table 1. Tris-minimal salt medium (Zn solubilizing)

	$g.L^{-1}$
D-Glocose	10
Agar	15
$CaCl_2.2H_2O$	0.03
$MgCl_2.6H_2O$	0.2
Na_2SO_4	0.43
NH_4Cl	1.07
KCl	1.49
NaCl	4.68
$Zn_3(PO_4)_2$	1.99

آزمون کیفی توانایی انحلال ترکیبات نامحلول روی

بررسی کیفی توان انحلال ترکیبات نامحلول روی توسط سویه های مورد مطالعه با قرار دادن پنج میکرولیتر سوسپانسیون فعال باکتری با غلظت 10^8 سلول در میلی‌لیتر هر سویه باکتری، روی محیط کشت جامد Tris-minimal salt medium و حاوی ترکیبات نامحلول روی است، انجام شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از هفت روز قطر هاله شفاف (Halo zone diameter) اطراف پرگنه باکتری که نشان‌دهنده انحلال روی است، اندازه‌گیری شد. سپس شاخص حلالیت باکتری‌های حل‌کننده روی محاسبه گردید. شاخص حلالیت به صورت حاصل‌جمع قطر پرگنه و قطر هاله شفاف تقسیم بر قطر پرگنه بدست آمد (Tallapragada & Seshachala, 2012, Gandhi *et al.*, 2014). جدایه‌ای که بیشترین شاخص حلالیت را بخود اختصاص داده به‌عنوان جدایه مورد نظر در حامل میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون کمی توانایی انحلال ترکیبات نامحلول روی

برای این منظور تمامی جدایه‌هایی که شاخص حلالیت بالایی در محیط جامد نشان داده بودند انتخاب شدند (۱۵جدایه). سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون فعال باکتری‌ها با غلظت 10^8 سلول در میلی‌لیتر به ۵۰ میلی-لیتر محیط کشت مایع Tris-minimal salt medium حاوی ۰/۱ درصد ترکیبات روی نامحلول اضافه شدند. مجموعه به مدت ۱۰ روز روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. برای هر سویه سه تکرار در نظر گرفته شد و سپس ۱۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های حاصل با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از عبور سوسپانسیون از کاغذ صافی، میزان روی محلول با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (Mumtaz *et al.*, 2017).

آزمون‌های شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری‌ها

آزمون‌های شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه‌ها شامل رنگ‌آمیزی گرم، تحرک، اکسیداسیون یا تخمیرگلوکز (O/F)، سیترات، هیدرولیز نشاسته، کاتالاز، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین، و آزمون تولید رنگدانه فلورسنت توسط سویه‌ها روی محیط King'B مورد بررسی قرار گرفت (Lelliot & Stead, 1987; Schaad *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2005).

شناسایی مولکولی سویه‌های باکتری

شناسایی مولکولی شش سویه باکتری که توان حلالیت ترکیبات نامحلول روی بالاتری داشتند، با استفاده از آغازگرهای عمومی انجام شد. دی‌ان‌آ ژنومی سویه‌های باکتری به روش لوپ و همکاران (Llop *et al.*, 1999) استخراج شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی fD1/rP2 (جدول ۲) مربوط به ژن 16S rRNA (Weisburg *et al.*, 1991) در دستگاه ترموسایکلر انجام شد.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن 16S rRNA (Weisburg *et al.*, 1991).

Table 2. The universal primers used based on the gene 16S rRNA, used in this study (Weisburg *et al.*, 1991)

Primer	Primer sequence
fD1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
rP2	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

ترکیب و مقادیر مواد مورد استفاده در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۲ میکرولیتر PCR Master Mix (Ampliqon) Red - $Mgcl_2$ 180301-50، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول) و دی‌ان‌آ الگو (۵۰ نانوگرم) بود. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل سیکل واسرشت اولیه (Initial denaturing) ۹۴ درجه سلسیوس ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل واسرشت‌سازی (Denaturing) ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) ۵۷ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، بسط (Extension) ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و سیکل بسط نهایی (Final extension) ۷۲ درجه سلسیوس۱۰ دقیقه بود. بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی ژل انجام شد. تعیین ترادف محصول PCR با ارسال قطعه تکثیر شده و آغازگرهای استفاده شده به شرکت بایونیر کره‌جنوبی انجام شد. استخراج و اصلاح توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزارهای Chromase و BioEdit انجام شد و توالی‌های نهایی بصورت فرمت فستا (FASTA) ذخیره شدند. دو توالی پیشرو و پسرو از یک سویه با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench8 همردیف‌سازی و تنظیم شدند. مقایسه میزان قرابت سویه‌های مورد مطالعه با سویه‌های نزدیک به آن‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) با جستجوی در برنامهBLAST (Basic Local Alignment) انجام گرفت.

بررسی جمعیت زنده باکتری در تیمارهای حامل مختلف

در این آزمایش از حامل‌های جامد (شامل پرلیت، پیت ماس، خاک اره، تفاله چغندرقند، کود دامی، ورمی-کمپوست، آزولا، بیوچار (آزولا و سیب)، سبوس و تالک) استفاده شد (جدول ۲). حامل‌های جامد پس از هوا خشک شدن، آسیاب شده و از غربال ۱۰۶ میکرون عبور داده شدند. سپس برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن‌ها نظیر ظرفیت نگهداری آب (Arora *et al.*, 2014)، pH و EC (در نسبت ۱:۱۰) اندازه‌گیری شد (Page *et al.*, 1982). لازم به ذکر است که تمامی حامل‌ها برای داشتن pH خنثی، توسط کربنات کلسیم و اسید سولفوریک تعدیل pH شدند (جدول ۳). همچنین EC برخی حامل‌ها (کود دامی و ورمی کمپوست) بالا بود که با شستشو با آب مقطر (به کمتر از $1dS\ m^{-1}$) رسانده شد. ده گرم از حامل‌های جامد در داخل کیسه‌ها پلی اتیلن ریخته و سپس حامل‌ها در اتوکلاو در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. برای تلقیح به میزان یکسان (با کمترین ظرفیت نگهداری برای حامل‌های بدست آمده) از یک سویه باکتری حل‌کننده روی (*سودوموناس فلورسنس*) کشت شبانه با جمعیت حدود 10^8 تزریق شد در نهایت همه حامل‌ها با مقدار آب محاسبه شده به ظرفیت نگهداری آب رسانده شدند. حامل‌ها در جعبه‌هایی با تهویه مناسب در دمای اتاق قرار گرفتند و هر ماه (بصورت حذفی) از حامل‌ها با سه تکرار نمونه برداری شده و جمعیت باکتری به روش MPN (بیشترین تعداد احتمالی) در هر حامل بررسی شد (Aleksander,1982).

جدول ۳- درصد رطوبت ظرفیت نگهداری آب و pH حامل‌ها

Table 3. Moisture of water holding capacity (%) and pH of carriers

Carrier	Moisture of water (٪) holding capacity	adjusted pH	Initially pH
Talk	106	6.9	7.7
Azula biochar	57	7.1	8.3
Azula	92	6.8	8.3
Apple biochar	71	7.1	7.5
Perlite	85	6.8	7.5
Manure	94	7	8.5
Vermicompost	101	7.1	8.2
Peat moss	69	6.9	7.9
Bran	280	7	5.9
Sawdust	109	6.9	5.9
Beet pulp	120	6.9	7.9

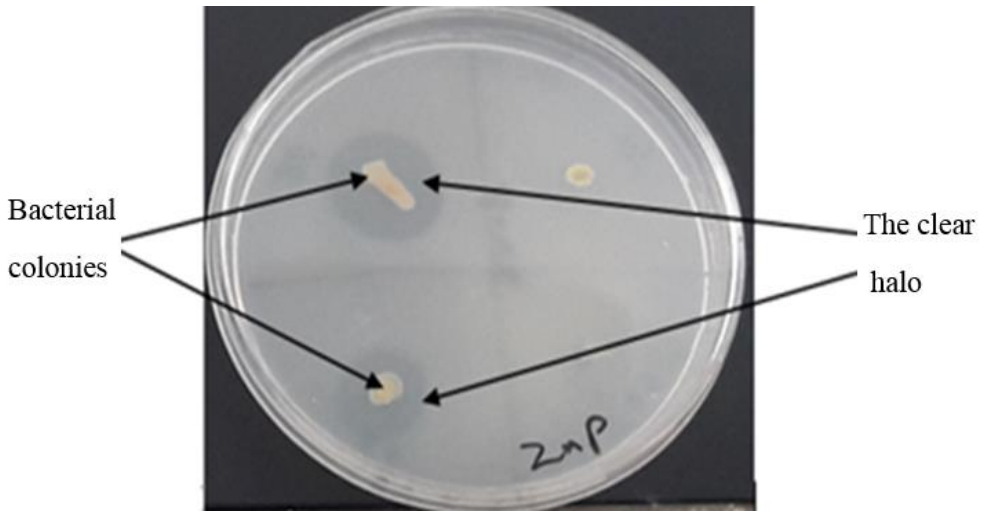
طرح آزمایشی و تجزیه‌های آماری

جهت برآورد بهترین سویه از نظر شاخص حلالیت از طرح کاملا تصادفی و همچنین برای بدست آوردن بهترین حامل از طرح پایه کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل با دو فاکتور (زمان و نوع حامل) و سه تکرار استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه‌ها

از ۲۴ نمونه خاک ریزوسفری، تعداد ۱۵ سویه باکتری حل‌کننده روی جداسازی و خالص‌سازی گردید. غربالگری و جداسازی باکتری‌ها حل‌کننده روی با استفاده از محیط اختصاصی Tris-minimal salt medium و ترکیب نامحلول فسفات روی و ایجاد هاله شفاف در اطراف پرگنه‌ها صورت گرفت (شکل۱). نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد، همه سویه‌ها گرم منفی و هوازی اجباری بودند و آزمون‌های سیترات، کاتالاز و اوره آز مثبت ولی آزمون هیدرولیز نشاسته منفی بود. واکنش سویه‌ها در آزمون‌های تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ-بی، اکسیداز، ژلاتیناز، Sim و تولید سولفید هیدرژن از سیستئین متغیر بودند به طوری که واکنش به ترتیب ۴۰، ۵۳/۳، ۶۶/۷، ۱۳/۳ و ۲۶/۷ درصد از سویه‌ها در آزمون-های ذکر شده مثبت و واکنش مابقی سویه‌ها منفی بود (جدول ۴).



شکل ۱- کلنی باکتری و هاله شفاف اطراف آن

Figure 1. Bacterial colony and halo zone around it

بررسی توانایی کیفی سویه‌ها در انحلال ترکیبات روی نامحلول

ارزیابی توانایی کیفی جدایه‌ها، براساس ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها (شاخص حلالیت) صورت گرفت. شاخص حلالیت پنج سویه شناسایی شده فسفات‌روی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شاخص حلالیت بین سویه‌های باکتریایی بر فسفات روی معنی‌دار شد مقایسه میانگین بیانگر آن است که دو باکتری (Ur 21 و Ur 22) *Pseudomonas fluorescence* از شاخص حلالیت بالاتری نسبت به بقیه برخوردار بودند (شکل ۲).

ممکن است تفاوت باکتری‌های مختلف در انحلال ترکیبات نامحلول روی تولید اسیدهای آلی متفاوت باشد که برخی جدایه‌ها کارایی بیشتری در انحلال نشان دادند. ضهیر و همکاران (Zaheer *et al.*, 2019) بیان داشتند که علت انحلال ترکیبات نامحلول روی تولید اسیدهای آلی مانند اسید استیک، اسید اگزالیک و گلوکونیک توسط جنس‌های *سودوموناس* و اسید سیتریک، اسید لاکتیک، اسید مالیک و اسید سوکسینیک بیشتر توسط جنس‌های *باسیلوس* بود. ممکن است هم به علت سازگاری با آن ترکیب نامحلول خاص باشد بدین مفهوم که این باکتری از محلی جداسازی شده که آن ترکیب نامحلول بیشتر

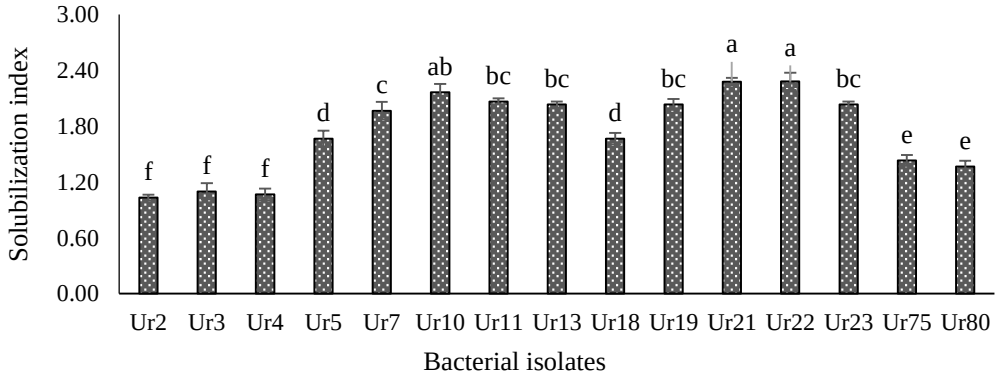
بوده و جدایه مورد نظر قبلا با آن سازگار شده است. سراوانن و همکاران (Saravanan *et al*., 2003) گزارش کردند که باکتری‌های که از معدن اسفالریت جداسازی شدند قادر بودند مقدار بیشتری روی از این ترکیب نامحلول (اسفالریت) در مقایسه با اکسید و کربنات روی آزاد کنند و شاخص انحلال نیز در این ترکیب بالاتر بود. در حالی‌که سایر جدایه‌هایی که از مناطق دیگر جداسازی شده بودند مقدار روی کمتر از اسفالریت در مقایسه با دو ترکیب دیگر آزاد کردند.

جدول۴- آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری‌های حل‌کننده ترکیب نامحلول روی

Table 4. The phenotypic and biochemical assays on insoluble Zn compounds-solubilizing bacteria

Isolate code	Gram	O/F	Oxidase	Gelatinase	SIM*	Catalase	H_2S	Citrate	Urease	King'B	Starch
Ur2	-	Obligate aerobes	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Ur3	-	Obligate aerobes	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Ur4	-	Obligate aerobes	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Ur5	-	Obligate aerobes	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Ur7	-	Obligate aerobes	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Ur10	-	Obligate aerobes	+	+	-	+	-	+	+	+	-
Ur11	-	Facultative anaerobes	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Ur13	-	Facultative anaerobes	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Ur18	-	Obligate aerobes	-	+	-	+	-	+	+	+	-
Ur19	-	Obligate aerobes	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Ur21	-	Obligate aerobes	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Ur22	-	Obligate aerobes	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Ur23	-	Obligate aerobes	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Ur75	-	Obligate aerobes	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Ur80	-	Obligate aerobes	+	+	+	+	+	+	+	-	-

* SIM = sulfide indole motility



شکل ۲- شاخص انحلال جدایه‌های باکتریایی بر فسفات روی

Figure 2. The solubilization index of bacterial isolates on $Zn_3(PO_4)_2$

بررسی توانایی کمی سویه‌ها در انحلال ترکیبات روی نامحلول

تجزیه واریانس، نشان داد که سویه‌های باکتری بر آزادسازی روی نامحلول در هر سه ترکیب معنی‌دار (p <۰/۰۱) شدند. مقایسه میانگین سویه‌های باکتری بر آزادسازی روی نامحلول از فسفات روی بیانگر آن است که بالاترین مقدار روی آزادسازی شده (۱۷/۷میلی‌گرم در لیتر)، پس از ده روز انکوباسیون، مربوط به سویه (*Pseudomonas fluorescence*) بوده که با بقیه باکتری-ها اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین مقدار (۳/۲ میلی-گرم در لیتر) نیز مربوط به شاهد بود (جدول ۵).

میکروارگانیسم‌های، قادرند مقادیر قابل‌توجهی از اسیدهای آلی را تولید نمایند. اسیدهای آلی ناشی از فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها منجر به کاهش pH شده و از طریق افزایش اسیدیته کل، ظرفیت آزادسازی کاتیون‌هایی نظیر روی را افزایش می‌دهند (..(Badr, 2006). بر اساس یافته‌های چندین محقق که گزارش نمودند، اسیدهای آلی نظیر گلوکونیک، استیک، اگزالیک، فوماریک، تارتاریک و سیتریک توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و از این طریق منجر به کاهش pH و انحلال ترکیب نامحلول می‌گردند (Girgis *et al*., 2008; Meena *et al*., 2014).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل جدایه‌های باکتریایی و فسفات روی بر مقدار انحلال روی

Table 5. Comparison of the mean interaction of bacterial isolates and zinc phosphate ($ZnPO_4$) on the amount of zinc solubilization

Isolate code	$ZnPO_4$ (mg L^{-1})
Control	16.16^{k}
Ur10	69.16b
Ur13	41.66^{e}
Ur11	38.66^{f}
Ur21	55.83^{d}
Ur22	75.16^{a}
Ur23	56.16^{d}

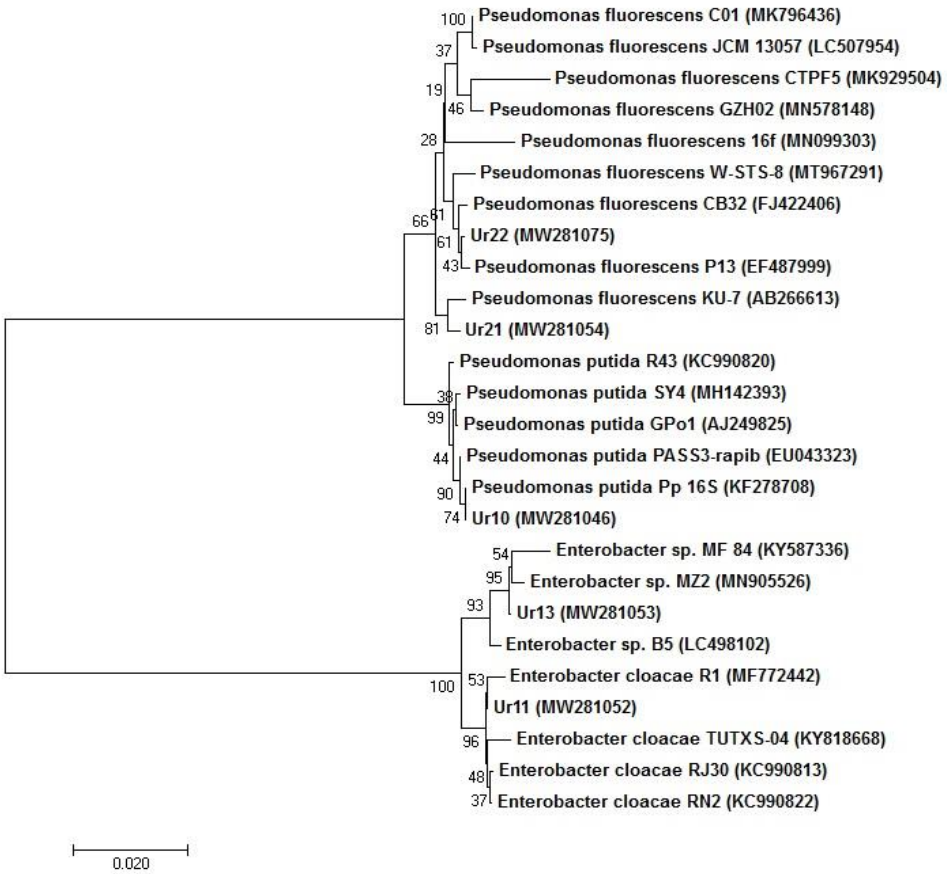
شناسایی مولکولی سویه‌های برتر

از بین ۱۵ جدایه باکتری‌های حل‌کننده روی، شش جدایه‌ی برتر از لحاظ انحلال روی انتخاب و جهت شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن است که جدایه‌های Ur 10، Ur 11، Ur 13، Ur 21 و Ur 22 دارای بیشترین شاخص حلالیت بودند (شکل ۲). این سویه‌ها بر اساس توالی ژن 16S rRNA به آرایه‌های *Pseudomonas putida*، *Enterobacter cloacae*، *Enterobacter* sp. و *Pseudomonas fluorescens* تعلق داشتند (شکل ۳) و به عبارت دیگر سه جدایه به جنس *سودوموناس* و دو جدایه به *انتروباکتر* تعلق داشتند (جدول ۶). تامبولی (Tamboli, 2019) از ده نمونه خاک ریزوسفری گندم ده جدایه باکتری جداسازی و مورد شناسایی براساس خصوصیات مورفولوژیکی قرار داد و بیان داشت که ۳۰ درصد جدایه ها از جنس سودوموناس و ۷۰ درصد بقیه به جنس باسیلوس تعلق داشتند. همه سویه‌های سودوموناس از نظر تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز و اکسیداز مثبت و از نظر تست سیترات فقط ۶۶ درصد پاسخ مثبت دادند. کاستروس و همکاران(Costerousse *et al*., 2018) ۱۱۵ جدایه از میکروارگانیسم حل کننده ترکیب نامحلول روی (اکسید روی) را جداسازی و ۲۸ جدایه را مورد شناسایی قرار دادند و گزارش کردند که حدود ۳۲ درصد از جنس *Pseudomonas* و ۳۲ درصد از جنس *Microbacterium* و ۱۸ در از جنس *Bacillus* بودند. از بین این باکتریها بیشترین کارایی انحلال روی (۱۲/۹) به گونه‌ای از *Pseudomonas* تعلق داشت. تامبولی در مطالعه خود نشان داد که از ده جدایه باکتری مورد ارزیابی جهت انحلال ترکیبات نامحلول روی (اکسید روی و کربنات روی)، به ترتیب *Bacillus cereus* و *Bacillus thuringenesis* دارای بیشترین (۳۴ میلی‌متر) و کمترین(۱۷ میلی‌متر) قطر هاله بودند و *Pseudomonas fluroscence* دارای قطر هاله ۲۶ میلی متر بود.

جدول ۶- شناسایی باکتری‌های با بالاترین شاخص انحلال روی نامحلول، بر اساس توالی یابی 16S rRNA

Table 6. Identification of the bacteria with highest insoluble Zn-solubilizing index, based on 16S rRNA sequencing

Isolate code	Species	Accession number
Ur10	*Pseudomonas putida*	MW281046
Ur11	*Enterobacter cloacae*	MW281052
Ur13	*Enterobacter* sp.	MW281053
Ur21	*Pseudomonas fluorescens*	MW281054
Ur22	*Pseudomonas fluorescens*	MW281075



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک پنج سویه باکتری‌یایی منتخب (بر اساس توالی یابی 16S rRNA)

Figure 3. Phylogenetic tree of 16SrDNA partial sequences from selected five bacterial strains

اثر حامل‌های مختلف بر جمعیت باکتری *سودوموناس فلورسنس* در مدت نه ماه

نتایج تجزیه واریانس اثر فاکتور زمان و حامل، بر جمعیت باکتری‌ها (زنده‌مانی) را نشان می‌دهد (جدول ۷). اثر اصلی و اثر متقابل تیمارها بر تعداد باکتری در سطح یک درصد معنی‌دار شد. نتایج زنده‌مانی باکتری بر روی حامل-ها در جدول ۸ نشان می‌دهد که از ماه اول تا ماه نهم در همه حامل‌ها جمعیت کاهش یافته ولی این کاهش در حامل تالک چشمگیر بود بطوری که از ماه سوم با بقیه حامل‌ها اختلاف معنی داری داشت. احتمالا با گذشت زمان عوامل مختلفی از قبیل کمبود عناصر غذایی، تجمع متابولیت‌های بازدارنده، ورود باکتری‌ها به فاز توقف و مرگ رشد، رقابت بین باکتری‌ها و غیره باعث کاهش جمعیت باکتری گردید. از میان حامل‌ها، حامل‌های تالک در مدت نه ماه با جمعیت ۲/۱۱ کمترین جمعیت زنده باکتری را دارا بود و با بقیه حامل‌ها اختلاف معنی داری داشتند. حامل‌های بیوچار آزولا، ورمی‌کمپوست، پرلیت، سبوس و پیت ماس و بیوچار سیب توانستند تعداد باکتری را به مدت پنجم ماه، بالاتر از 10^7 CFU g^{-1} (مقدار جمعیت قابل قبول) حفظ کنند (Khavazi *et al.*, 2013). لازم به ذکر است، حامل‌هایی که جمعیت زنده باکتری را برای مدت کوتاهی حفظ می‌کنند، برای مصرف سریع و فوری و در مواقعی که فاصله محل تولید و مصرف کوتاه باشد، می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (Ghasemi Piranloo *et al.*, 2019). همچنین در پایان آزمایش (ماه نهم)، مقایسه میانگین بین حامل‌ها نشان داد که در بین این ۱۱ حامل، بیوچار سیب و بیوچار ازولا دارای بیشترین تعداد باکتری در واحد جرم زادمایه در مقایسه با پیت ماس بوده‌اند. تالک نیز دارای کمترین تعداد باکتری در واحد جرم زادمایه بود. دلیل این کاهش را در خواص فیزیکی و شیمیایی آن بایستی جستجو کرد. بقیه حامل‌ها دارای روند تقریباً یکسانی بودند. پیت به دلیل داشتن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسب (ظرفیت نگهداری آب بالا، سطح ویژه بالا، هدایت الکتریکی پایین و ...)، اغلب

برای تولید زادمایه ریزوبیوم در جهان برای چند دهه به عنوان یک حامل مناسب مورد تأیید بوده و در بسیاری از کشورهای پیشرفته مانند کانادا، آمریکا، روسیه و استرالیا به عنوان حامل استفاده می‌شود. به همین جهت از پیت به عنوان حامل استاندارد و مطلوب یاد شده و از آن برای مقایسه سایر حامل‌ها با آن استفاده شد (Khavarzi & Rajali, 2000) در این تحقیق، بیوچار سیب به عنوان بهترین ماده حامل *سودوموناس فلورسنس* تعیین شد. زیرا علاوه بر آنکه کلیه مشخصات یک حامل مطلوب (مانند ظرفیت نگهداری رطوبت مناسب، سطح تماس کافی و استاندارد بذر با چسبندگی، شرایط تهویه‌ای مناسب، عدم سمیت برای سویه باکتری، گیاه و خاک، مقرون به‌صرفه بودن از نظر اقتصادی، تخلخل مناسب، سطح ویژه بالا، pH خنثی یا نزدیک به خنثی) را دارد از یک ویژگی بسیار خوب نسبت به پیت برخوردار می‌باشد. این ویژگی عدم نیاز به تنظیم کننده‌های pH می‌باشد، چون در مورد پیت برای تعدیل pH از کربنات کلسیم استفاده می‌شود (Khavarzi & Rajali, 2000; Ghasemi Piranloo *et al.*,, 2019). اثرات مثبت بیوچار بر زنده‌مانی باکتری را ویژگی‌های مطلوب بیوچار مانند بهبود شرایط تغذیه‌ای از جمله ارائه دهنده کربن اضافی، pH، جذاب مواد سمی و غیره نسبت می‌دهند (Castaldi *et al.*, 2011).

جدول ۷- تجزیه واریانس اثر زمان و حامل‌های جامد بر جمعیت باکتری

Table 7. Variance analysis of the effect of time and solid carriers on bacterial population

Source of variation	df	MS
Carrier	10	13.5^{***}
Time	8	82.2^{***}
C*T	80	0.338^{***}
Error	198	0.040^{***}
CV (%)		2.91

جدول ۸ - مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت باکتری در حامل‌های جامد مختلف در طول نه ماه

Table 8. Comparison of the mean of the bacterial population (log) in different solid carriers in nine months

	Time (month)								
carriers	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Talk	8.39b	8.15bcd	4.89k	4.89k	4.48 l	3.39 m	3.1 mn	3.05 n	2.11 o
Biochar Azula	8.89 a	8.89 a	8.11 bcd	7.89 d	7.07 ef	6.39 gh	6.07 hi	5.39 j	5.07 jk
Azula	8.89 a	8.89 a	8.89 a	7.89 d	6.74 fg	6.41 h	6. 1 hi	5.11 jk	5.04 jk
Vermicompost	8.99a	8.89a	7.99d	7.94d	7.39 e	6.4 gh	6.07 hi	5.39 j	5.04 jk
Perlite	8.89a	8.89a	8.39 b	7.89 d	7.07 ef	6.1 hi	6.11 hi	5.15 jk	4.99 k
Manure	8.94 a	8.89 a	7.89 d	7.89 d	6.99 f	6.07 hi	5.99 i	5.07 jk	4.94 k
Bran	8.89 a	8.89 a	8.11 bcd	7.94 d	7.11 ef	6.07 hi	5.99 i	5.11 jk	4.99 k
Sawdust	8.99a	8.94 a	8.39 b	7.89 d	6.99 f	6.07 hi	5.99 i	5.11 jk	4.99 k
Peat moss	8.99 a	8.89 a	8.39 b	7.99 d	7.39 e	5.94 i	5.94 i	5.07 jk	4.99 k
biochar Apple	8.99 a	8.89 a	8.36 bc	7.94 d	7.11 ef	6.39 h	6.07 hi	5.17 jk	5.07 jk
Beet pulp	8.89 a	8.89 a	8.39 b	7.9 cd	6.94 f	6.07 hi	5.99 i	5.11 jk	4.94 k
$LSD_{0.05}$									0.3220

میانگین‌های داری حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن درسطح احتمال ۵ درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.

Means with similar letters are not significantly different at 5% probability level according to Duncan tests.

همچنین بیوچار سیب می‌تواند از نظر ویژگی‌های فیزیکی شرایط مطلوبی را برای زنده‌مانی باکتری فراهم نماید. بیوچار سیب با تخلخل مناسب و سطح ویژه بالا می‌تواند در نگهداری باکتری‌ها موثر باشد. تأثیر بیوچار بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها بستگی به مواد اولیه و شرایط فرآیند تولید دارد (Salem *et al.*, 2013; Muhammad *et al.*, 2014; Vahedi *et al.*, 2021). چسبندگی باکتریایی به بیوچار نیز به اندازه منافذ بستگی دارد (Rivera-Utrilla *et al.*, 2001). اندازه منافذ برای چسبندگی مطلوب باید ۲-۵ میکرومتر باشد. (Samonin & Elikova, 2004). احتمال دارد که توانایی بیوچارها برای حفظ باکتری‌ها به شدت متفاوت باشد. آروجو و همکاران (Araujo *et al.*, 2020) زنده‌مانی باکتری برادی‌ریزوبیوم را در حامل‌های مختلف (لجن فاضلاب، بیوچار پوست کاج، بستر طیور و

پرلیت (به عنوان شاهد) به مدت یکسال بررسی کردند و بیان داشتند که بیوچار پوست کاج و پرلیت دارای بالاترین زندمانی باکتری ریزوبیوم بوده و بعنوان حامل این باکتری برای آزمایش مزرعه‌ای انتخاب شدند.

نتیجه‌گیری کلی

از ۲۴ نمونه خاک، ۱۵ جدایه باکتریایی حل‌کننده ترکیبات نامحلول روی جداسازی و از بین آن‌ها ۶ جدایه برتر، برای شناسایی مولکولی و توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفتند. از بین ۱۵ جدایه ۴۰ درصد باکتری‌ها خاصیت فلورسنس داشته، ۱۰۰ درصد باکتری‌ها گرم منفی و از نظر هیدرولیز نشاسته منفی بودند، ۴۶ درصد کاتالاز مثبت بوده و ۱۳ درصد دارای تحرک بودند. شناسایی مولکولی جدایه‌ها نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده از جنس‌های *سودوموناس پوتیدا*، *انتروباکتر کلوآسه*، *انتروباکتر*، *سودوموناس فلورسنس*، *سودوموناس فلورسنس و استنوتروفوموناس مالتوفیلی* بودند. در بررسی توانایی کیفی جدایه‌های مختلف، باکتری‌های سودوموناس فلورسنس (Ur 21 و Ur 22) توان کمی بالایی در انحلال ترکیبات نامحلول روی داشته‌اند. در بررسی حامل مناسب جهت زنده‌مانی باکتری سودوموناس فلورسنس بعد از نه ماه انکوباسیون در دمای اتاق، نشان داد که از بین ۱۱ حامل، بیوچار آزولا و بیوچار سیب دارای بیشترین جمعیت زنده‌مانی در واحد جرم زادمایه و حامل معدنی تالک کمترین تعداد باکتری در واحد جرم زادمایه را به خود اختصاص داده‌است. هر چند بین بیوچارها و پیت ماس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی با توجه به وارداتی بودن بیشترین مقدار پیت ماس (خروج ارز از کشور) و pH نسبتا پایین آن، در این پژوهش استفاده از بیوچار به عنوان حامل میکروبی پیشنهاد می‌گردد.

References

Alexander M. 1982. Most probable number method for microbial populations. *In*: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), Methods of Soil Analysis, Part 2, 2nd Ed. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 815-820.

Andreini C., Bertini I., and Rosato A. 2009. Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Accounts of Chemical Research,* 42: 1471–1479.

Araujo J., Díaz-Alcántara C.A., Urbano B., and González-Andrés F. 2020. Inoculation with native *Bradyrhizobium* strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *European Journal of Agronomy*, 113: p.125985.

Arora N.K., Khare E., and Maheshwari D.K. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. In Plant growth and health promoting bacteria Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 97-116.

Badr M.A. 2006. Efficiency of K-feldspar combined with organic materials and silicate dissolving bacteria on tomato yield. *Journal of Applied Sciences Research*, 2:1191–1198.

Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16(4): 729-770.

Bonnier, C. (1960). Symbiose Rhizobium-légumineuses: Aspects particuliers aux régions tropicales. *Annales de l'Institut Pasteur*, 98: 537-556.

Brenner D.J., Krieg N.R., and Statey J.T. 2005. Editors. Bergie's manual systematic bacteriology. 2nd ed. New York: Springer; Part C.

Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., and Lux, A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist*. 173: 677–702.

Castaldi S., Riondino M., Baronti S., Esposito F., Marzaioli R., Rutigliano F., and Miglietta F. 2011. Impact of biochar application to a Mediterranean wheat crop on soil microbial activity and greenhouse gas fluxes. *Chemosphere*, 85(9): 1464-1471.

Chao W.L. and Alexander M. 1984. Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1): 94-97.

Chen, J. H. 2006**.** The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. In International workshop on sustained management of the soil-rhizosphere system for efficient crop production and fertilizer use. Land Development Department Bangkok Thailand. 16: 20.

Costerousse B., Schönholzer-Mauclaire L., Frossard E., and Thonar C. 2018. Identification of Heterotrophic Zinc Mobilization Processes among Bacterial Strains Isolated from Wheat Rhizosphere (*Triticum aestivum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 84: 1-16.

Date R. A. 1988. Colonization of the rhizosphere by root-nodule bacteria. Microbiology in Action. Research Studies Press, Chichester. Eds. I Kennedy and W Murrell.

Egamberdiyeva D., Juraeva D., Poberejskaya S., Myachina O., Teryuhova P., Seydalieva L., and Aliev A. 2004. Improvement of wheat and cotton growth and nutrient uptake by phosphate solubilizing bacteria. In Proceeding of 26th annual conservation tillage conference for sustainable agriculture, Auburn. Pp. 58-65.

Fages J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis*, 13: 15-26.

Fasim F., Ahmed N., Parsons R., and Gadd G. M. 2002. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS microbiology letters*, 213(1):1-6.

Ferreira E.M. 2005. Residues of the cork industry as carriers for the production of legume inoculants. *Silva Lusitana*, 13(2):159-167.

Gandhi A., Muralidharan G., Sudhakar E., and 2Murugan A. 2014. Screening for elite zinc solubilizing bacterial isolate from rice rhizosphere environment. *International Journal of Recent Scientific Research*. 5:2201-2204

Ghasemi Piranloo, F., Sarikhani, M. R., Najafi, N. 2019. Study of *Enterobacter cloacae* viability in several solid carriers and the effect of prepared offspring on wheat germination and growth. *Agricultural Knowledge and Sustainable Production*, 29:167-180. (In Persian)

Girgis M.G.Z., Khalil H.M., and Sharaf M.S. 2008. In vitro evaluation of rock phosphate and potassium solubilizing potential of some Bacillus strains. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(1): 68-81.

Huber D., El-Nasshar H., Moore L., Mathre D., and Wagner J. 1989. Interaction between a peat carrier and bacterial seed treatments evaluated for biological control of the take-all diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biology and fertility of soils*, 8(2): 166-171.

Khavarzi K., and Rajali F. 2000. Use of some inexpensive materials as a carrier of *Bradyrhizubium japonica*. *Journal of Soil and Water*, 14: 45-36. (In Persian)

Khavazi K., Asgharzadeh A., Rajali F., Asadi Rahmani H., Besharti H., Fallah Nusratabad A.R., Afshari M., Khosravi H., Khademi Z., Bazarga K. 2013. Instructions on how to study biofertilizers. Soil and Water Research Institute, SADES Publications, Pp. 44. (In Persian)

Leach A., and Mumford J. 2008. Pesticide Environmental Accounting: A method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental pollution*, 151(1): 139-147.

Lelliot R.A., and Stead D.E. 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications.

Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C. and Lopez M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1): 23-31.

Mashhadi Asghari S., and Ali Asgharzadeh N. 2003. Comparison of the efficacy of several carriers of *Sinorizobium meliloti* to produce alfalfa inoculum. *Journal of Science and Technology Agricultural and Natural Resources*, 8:63-75. (In Persian)

Meena V.S., Maurya B.R., and Bahadur I. 2014. Potassium solubilization by bacterial strain in waste mica. *Bangladesh Journal of Botany*, 43(2):235–237.

Motsara M.R., Bhattacharyya B., and Srivastava B. 1995. Biofertiliser technology, marketing and usage: a sourcebook-cum-glossary. Fertiliser Development and Coordination Organization, New Delhi.

Muhammad N., Dai Z, Xiao K., Meng J., Brookes P.C., Liu X., and Xu J. 2014. Changes in microbial community structure due to biochars generated from different feedstocks and their relationships with soil chemical properties. *Geoderma*, 226: 270-278.

Mukhtar S., Shahid I., Mehnaz S., and Malik K.A. 2017. Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Microbiological research*, 205:107-117.

Mumtaz, M.Z., Ahmad, M., Jamil, M., Hussain, T. 2017. Zinc solubilizing Bacillus spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiological Research*, 202: 51–60.

Myers S.S., Wessells K.R., Kloog I., Zanobetti A., Schwartz J. 2015. Effect of increased concentrations of atmospheric carbon dioxide on the global threat of zinc deficiency: a modelling study. *The Lancet Global Health,* 3: 639–645.

Shaikh S.S., and Saraf M.S. 2017. Optimization of growth conditions for zinc solubilizing plant growth associated bacteria and fungi. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 2(1):1–9.

Page A.L., Miller R.H., and Keeney D.R. 1982. Method of soil analysis. part 2- chemical and microbiological properties. 2nd ed., ASA pub. Buxton, Madison, WI, 159-166.

Rivera-Utrilla J., Bautista-Toledo I., Ferro-García M.A. and Moreno-Castilla C. 2001. Activated carbon surface modifications by adsorption of bacteria and their effect on aqueous lead adsorption. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(12): 1209-1215.

Salem M., Kohler J., Wurst S., and Rillig M.C. 2013. Earthworms can modify effects of hydrochar on growth of Plantago lanceolata and performance of arbuscular mycorrhizal fungi. *Pedobiologia,* 56(4): 219-224.

Samonin V., and Elikova E. 2004. A study of the adsorption of bacterial cells on porous materials. *Microbiology*, 73(6): 696-701.

Saravanan V.S., Subramoniam S.R., and Raj S.A. 2003. Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (ZSB) isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1-2):121-125.

Schaad N.W., Jones, J.B., and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, (Third Ed.) St. *Plant Pathology*, 50(6):812-814.

Shaikh S.S., Saraf M.S. 2017. Optimization of growth conditions for zinc solubilizing plant growth associated bacteria and fungi. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 2(1):1–9

Shariati S., Alikhani H.A., and Pourbabaei A. 2013. Application of vermicompost as a carrier of phosphate solubilizing bacteria (*Pseudomonas fluorescens*) in increase growth parameters of maize. *International Journal of Agronomy and Plant Production,* 4(8):2010-2017.

Somasegaran P., and Hoben H. J. 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology, Springer Science & Business Media. Pp.332-341.

Stephens J., and Rask H. 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65(2): 249-258.

Tallapragada P., Seshachala U. 2012. Phosphate-solubilizing microbes and their occurrence in the rhizospheres of Piper betel in Karnataka, India. *The Turkish Journal of Biology*, 36: 25-35.

Tamboli R.R. 2019. Isolation and Characterization of Zinc Solubilizing Bacteria from Rhizosphere soil of Latur District, Marathwada, India. *Biosciences biotechnology research asia*, 16: 797-803

Vahedi R, and Rasoili-Sadaghiani M.H. 2020. Bioavailability of Selected Micronutrients as Affected by Biochar and Compost of Trees Pruning in the Presence of Mycorrhiza at Wheat Rhizosphere. *Journal of Water and Soil Science,* 23 (4) :155-170. (In Persian)

Vahedi R., Rasouli-Sadaghiani M., Barin M., Vetukuri R.R. 2021. Interactions between Biochar and Compost Treatment and Mycorrhizal Fungi to Improve the Qualitative Properties of a Calcareous Soil under Rhizobox Conditions. *Agriculture*, 11: 993.

Van Elsas J.D., and Heijnen C. 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. *Biology and fertility of soils*, 10(2): 127-133.

Vessey J. K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2): 571-586.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., and Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2): 697-703.

Xavier I.J., and Holloway Leggett M. 2004. Development of rhizobial inoculant formulation. *Crop Management* 3(1):1-6.

Zaheer A., Malik A., Sher A., Mansoor Qaisrani M., Mehmood A., Ullah Khan S., Ashraf M., Mirza Z., Karim S., and Rasoo M. 2019. Isolation, characterization, and effect of phosphate-zinc-solubilizing bacterial strains on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth. *Saudi Journal of Biological Sciences,* 26: 1061–1067.

Isolation and Identification of Zn Solubilizing Bacteria and Evaluation of Various Carrier Efficacy in Superior Isolate Survival

Fatemeh Hashemnejad[1], Mohsen Barin[2]*, Maryam Khezri[3], Yubert Ghoosta[4]

(Received: september 2021 Accepted: June 2022)

Abstract

Zinc (Zn) is one of the micronutrients that is in calcareous soils in low solubility forms that is not usable for the plant. One of the ways of supplying Zn of the plant in these conditions is the use of microorganisms that increase the solubility of zinc-insoluble compounds in the soil. Biofertilizers play significant role in sustainable agriculture. Therefore, to provide them, different carriers are used to increase the longevity and survival of the bacteria. This study aimed to evaluate the effect of Zn solubilizing bacteria isolated from saline soils and to evaluate the survival of the superior strain in various solid carriers during nine months in a completely randomized two-factor basis design (carrier and Time) performed with three repetitions. Solid carriers included perlite, peat moss, sawdust, sugar beet waste, manure, vermicompost, azolla, biochar (azolla and apple), bran, and talc. In this study, bacterial inoculants prepared with the same initial population after storage at room temperature were compared for the survival of the bacteria. For counting the bacteria in microbial carriers, after dilution series preparation, the MPN counting method was used each month. The results showed that out of 24 samples of the rhizosphere soil, 15 strains of Zn-solubilizing bacteria were isolated and purified. Five isolates found to be the most efficient solubilizing insoluble Zn compounds were examined for molecular identification. Based on gene 16S rRNA sequencing, three isolates belonged to the genus of *Pseudomonas*, and two to *Enterobacter*. The highest solubility index (2.28) was related to *Pseudomonas fluorescens* strains which were used for inoculation of microbial carriers by the Ur 22 strain. The results of bacterial count in the carriers showed that among the tested carriers, the highest population counted after nine months in carriers of apple biochar (5.07 cfu g^{-1}) and azolla biochar (5.07 cfu g^{-1}), and the lowest population was obtained in talc carrier (2.11 cfu g^{-1}). In general, it can be said that among the tested carriers, biochar is recommended due to its good properties and cost-effectiveness.

Keywords: Biofertilizer; *Pseudomonas fluorescens;* Solid carrier; Survival

Hashemnejad, F., Barin, M., Khezri, M., Ghoosta, Y. 2023. Isolation and Identification of Zn solubilizing bacteria and Evaluation of various Carrier Efficacy in Superior Isolate Survival. *Applied Soil Research*, 11(1): 16-29.

1- Graduate Student of Soil Science, Urmia University, Urmia, Iran
2- Associate Professor, Department of Soil Science, Urmia University, Urmia, Iran
3- Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
*Corresponding Author Email: m.barin@urmia.ac.ir