Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

*Journal of Soil Management and Sustainable Production*

**Print ISSN: 2322-1267**
**Online ISSN: 2322-1275**

# The effect of humic acid and inoculation of Actinomycete isolates on phosphorus solubilization in laboratory condition and phosphorus content in maize (*Zea mays* L.)

**Niloofar Khalili[1], Reza Ghorbani Nasrabadi[*2], Mojtaba Barani Motlagh[3], Reza Khodadadi[4]**

1. M.Sc., Dept. of Soil Science Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: niloofar_kh75@yahoo.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Soil Science Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: rgnasr@yahoo.com
3. Associate Prof., Dept. of Soil Science Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mbarani2002@yahoo.com
4. Ph.D. Student, Dept. of Soil Science Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: khodadadireza71@gmail.com

**Article Info**

**Article type:**
Full Length Research Paper

**Article history:**
Received: 04.11.2023
Revised: 06.25.2023
Accepted: 07.04.2023

**Keywords:**
Actinomycete,
Combined Application,
Humic acid,
Phosphorus release

**ABSTRACT**

**Background and Objectives:** *Actinomycetes* are among the highly populated microbial groups in the soil, and they have significant positive effects on ecosystem preservation. Providing nutrients, especially phosphorus, in the plant rhizosphere, where its absorption is challenging for plants due to various reasons, is one of the positive effects of using growth-promoting actinomycetes. Humic acid is among the organic compounds that act as growth stimulants. Due to its significant role in soil fertility and the enhancement of soil microbial communities, it promotes the growth and activation of beneficial soil microorganisms residing in the rhizosphere of plants. It also improves the efficiency of phosphorus fertilizers. Therefore, the objectives of this study were as follows: 1) Screening the phosphate solubilization capacity of *actinomycete* isolates in various culture media, 2) investigating the effect of adding humic acid on soluble phosphorus concentration in different media cultures, 3) evaluating the effect of inoculation with selected isolate on growth, physiological parameters, and phosphorus content of the maize variety 'Single Cross 704' in the presence of humic acid and different levels of phosphorus fertilizer.

**Materials and Methods:** In this research, a total of 20 *Actinomycete* strains were isolated and purified from various agricultural and horticultural ecosystems in Golestan province, based on their morphological characteristics. These strains were utilized for screening purposes. The phosphate solubilization ability of bacterial strains was assessed in GA, NBRIP, and SMM media culture in the presence of commercial humic acid at a concentration of 0.5%. This experiment was conducted in a factorial arrangement within a completely randomized design, with the following factors: bacterial strain (20 isolated strains), culture media (GA, NBRIP, and SMM), and humic acid (application, non-application) with three replications under laboratory conditions. To evaluate the effects of a selected Actinomycete isolate and its combined effects with different levels of phosphorus and the application of humic acid, a pot experiment was conducted under light and ambient temperature

conditions in a completely randomized design with factorial arrangement of *Actinomycete* inoculation (control, inoculation), phosphorus fertilizer (control, 20 and 40 kg P per hectare), and humic acid with three replicates on Single Cross 704 maize plants.

**Results:** The screening results revealed that the NBRIP culture medium was more efficient for phosphorus release, and strains 47, 46, 79, 74, and 24 showed significant increases in phosphorus release. The application of humic acid resulted in an increase in the dissolution of tricalcium phosphate and the release of phosphorus by 11.12-, 118.06-, 4.76-, and 9.69-fold, respectively, in the NBRIP culture medium of the isolates mentioned. Isolate 47 exhibited the highest phosphorus solubility of 247.05 mg/litre with the addition of humic acid, and was selected as the superior isolate for the pot test. The sequencing results revealed that the superior isolate had the highest homology with the *Streptomyces chartreusis* isolate registered in the NCBI database with accession number KJ152149. The results of the pot experiment indicated that the optimal treatment was the combined application of high phosphorus content (40 mg/kg) with humic acid and *Streptomyces* inoculation (P2B1H1), which resulted in the highest amount of shoot biomass (13.97 g per pot), root biomass (8.2 g per pot), plant height (32.26 cm), chlorophyll (32.87 SPAD numbers), and phosphorus content (0.23 percent).

**Conclusion:** Based on the results of this study, inoculation with the screened streptomyces isolate and its combined application with humic acid improved the efficiency of phosphorus fertilizer utilization and provided it effectively for the plant.

Cite this article: Khalili, Niloofar, Ghorbani Nasrabadi, Reza, Barani Motlagh, Mojtaba, Khodadadi, Reza. 2023. The effect of humic acid and inoculation of Actinomycete isolates on phosphorus solubilization in laboratory condition and phosphorus content in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 13 (2), 75-94.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJSMS.2023.21253.2096
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار

شاپا چاپی: ۱۲۶۷-۲۳۲۲
شاپا آنلاین: ۱۲۷۵-۲۳۲۲

# اثر اسید هیومیک و مایه‌زنی جدایه‌های اکتینومایست بر حلالیت فسفر در شرایط آزمایشگاهی و محتوای فسفر گیاه ذرت (*Zea mays* L.)

نیلوفر خلیلی[۱]، رضا قربانی نصرآبادی*[۲]، مجتبی بارانی مطلق[۳]، رضا خدادادی[٤]

۱. کارشناس‌ارشد گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. رایانامه: niloofar_kh75@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. رایانامه: rgnasr@yahoo.com
۳. دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. رایانامه: mbarani2002@yahoo.com
٤. دانشجوی دکتری گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. رایانامه: khodadadireza71@gmail.com

**اطلاعات مقاله**

**نوع مقاله:**
مقاله کامل علمی- پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱٤۰۲/۰۱/۲۲
**تاریخ ویرایش:** ۱٤۰۲/۰٤/۰٤
**تاریخ پذیرش:** ۱٤۰۲/۰٤/۱۳

**واژه‌های کلیدی:**
آزادسازی فسفر،
اسید هیومیک،
اکتینومایست،
کاربرد تلفیقی

**چکیده**

**سابقه و هدف:** اکتینومایست‌ها از جمله گروه‌های میکروبی پرجمعیت خاکزی بوده که اثرات مثبت زیادی در حفظ اکوسیستم دارند. فراهمی عناصر غذایی به ویژه فسفر در ریزوسفر گیاه که به دلایل مختلف، جذب آن برای گیاه دشوار است از جمله اثرات مثبت کاربرد اکتینومایست‌های محرک رشد می‌باشد. اسید هیومیک از جمله ترکیبات آلی محرک رشدی بوده که به واسطه نقش مهمی که در حاصلخیزی و تقویت جامعه زیستی خاک دارد سبب افزایش رشد و فعال‌سازی جمعیت مؤثر ریزجانداران خاکزی مستقر در رایزوسفر گیاه و هم‌چنین کارایی مصرف کودهای فسفر می‌گردد. بر این اساس هدف از انجام این پژوهش: ۱) غربالگری میزان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های اکتینومایست در محیط‌های کشت مختلف ۲) بررسی اثر افزودن اسید هیومیک در میزان غلظت فسفر محلول در محیط‌های کشت مختلف ۳) ارزیابی اثر مایه‌زنی جدایه منتخب بر شاخص‌های رشدی، فیزیولوژیک و محتوای فسفر ذرت رقم سینگل کراس ۷۰٤ در حضور اسید هیومیک و سطوح کود فسفر بود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تعداد ۲۰ جدایه اکتینومایست که بر اساس ویژگی‌های ظاهری این باکتری از زیست‌بوم‌های مختلف زراعی و باغی استان گلستان جداسازی و خالص‌سازی‌شده بودند، برای غربالگری استفاده شد. توانایی حلالیت فسفات جدایه‌های باکتریایی در محیط‌های کشت GA[۱]، NBRIP[۲] و SMM[۳] در حضور اسید هیومیک تجاری با غلظت ۰/۰۵ درصد بررسی شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی

1- Glycerole Arginine
2- National Botanical Research Institutes Phosphate Growth Medium
3- Synthetic Minimal Medium

با فاکتورهای: جدایه باکتری (۲۰ جدایه خالص‌سازی شده)، محیط کشت (سه محیط کشت مرسوم حلالیت فسفر)، اسید هیومیک (کاربرد و عدم کاربرد) در سه تکرار در شرایط آزمایشگاهی طرح‌ریزی گردید. ارزیابی گلدانی به‌منظور بررسی تأثیر جدایه اکتینومایست منتخب و اثرات متقابل آن با سطوح مختلف فسفر و کاربرد اسیدهیومیک تحت شرایط نور و دمای محیط انجام گرفت. این ارزیابی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با تیمارهای آزمایشی مایه‌زنی اکتینومایست (شاهد، مایه‌زنی)، کود فسفر از منبع مونوآمونیوم فسفات (شاهد، ۲۰ و ٤۰ کیلوگرم فسفر خالص در هکتار)، اسیدهیومیک (شاهد، ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم) در سه تکرار بر روی گیاه ذرت رقم سینگل کراس ۷۰٤ انجام شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج غربالگری حلالیت فسفر در سه محیط کشت متفاوت نشان داد که حلالیت در محیط کشت NBRIP از کارایی بیش‌تری برخوردار بوده به طوری‌که آزادسازی فسفر در جدایه‌های ٤۷، ٤٦، ۷۹، ۷٤، ۲٤ افزایش قابل‌توجهی از خود نشان داد. پس از کاربرد اسید هیومیک در این محیط کشت، جدایه‌های مذکور انحلال فسفر از منبع تری کلسیم فسفات را به ترتیب ۱۱/۱۲، ۱۱۸/۰٦، ٤/۷٦ و ۹/٦۹ برابری افزایش دادند. بیش‌ترین میزان حلالیت فسفر در جدایه ٤۷ با کاربرد اسید هیومیک، به میزان ۲٤۷/۰۵ میلی‌گرم در لیتر به ثبت رسید. بنابراین، جدایه مذکور به عنوان جدایه برتر برای انجام آزمون گلدانی انتخاب شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که جدایه برتر بیش‌ترین همولوژی را با گونه استرپتومایسس کارترئوسیس[1] داشته و با شماره دسترسی KJ152149 در پایگاه NCBI ثبت گردید. نتایج پایش گلدانی نشان داد که بیش‌ترین میزان زیست‌توده اندام هوایی (۱۳/۹۷ گرم در گلدان)، ریشه (۸/۲ گرم در گلدان) ارتفاع بوته (۳۲/۲٦ سانتی‌متر)، کلروفیل (۳۲/۸۷)، محتوای فسفر (۰/۲۳ درصد) مربوط به تیمار بهینه کاربرد تلفیقی سطح بالای فسفر (٤۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به همراه اسید هیومیک و مایه زنی استرپتومایسس می‌باشد.

**نتیجه‌گیری**: بر اساس نتایج این پژوهش مایه‌زنی با جدایه *استرپتومایسس* غربالگری‌شده و کاربرد تلفیقی آن با اسید هیومیک سبب بهبود کارایی مصرف کود فسفر و فراهمی آن برای گیاه گردید.

**استناد**: خلیلی، نیلوفر، قربانی نصرآبادی، رضا، بارانی مطلق، مجتبی، خدادادی، رضا (۱۴۰۲). اثر اسید هیومیک و مایه‌زنی جدایه‌های اکتینومایست بر حلالیت فسفر در شرایط آزمایشگاهی و محتوای فسفر گیاه ذرت (*Zea mays* L.). *نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار*، ۱۳ (۲)، ۹۴-۷۵.

DOI: 10.22069/EJSMS.2023.21253.2096

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

1- *Streptomyces chartreusis*

## مقدمه

مصرف نامتعادل منابع کودی شیمیایی سبب برهم‌خوردن تعادل زیستی، تغییر ویژگی‌های بیوژئوشیمیایی خاک و کاهش کیفیت و بهره‌وری در سیستم‌های کشاورزی شده است (۱). امروزه استفاده از اکتینومایست‌ها به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB[1]) در کشاورزی مورد توجه بیش‌تری قرار گرفته است (۲). اکتینومایست‌ها به‌دلیل سازگاری مورفولوژیک و فیزیولوژیک منحصر به فرد، نسبت به سایر گروه‌های میکروبی موجود در خاک کم‌تر تحت‌تأثیر عوامل تنش‌زا و نامساعد محیطی قرار می‌گیرند. توانمندی حل‌کنندگی فسفات از ویژگی‌های مهم باکتری‌های محرک رشد گیاه است و این ویژگی در جنس‌های مختلف اکتینومایست از جمله *اکتینوپلانس*[2]، *استرپتومایسس*[3] و *میکرومونوسپورا*[4] گزارش شده است (۳).

فسفر از جمله عناصر غذایی اصلی برای گیاه بوده که در عملکردهای کلیدی رشد و نمو گیاه از جمله انتقال انرژی، فتوسنتز، تبدیل قندها، حرکت مواد مغذی در گیاه و انتقال ویژگی‌های ژنتیکی نقش مهمی دارد (٤). با وجود نقش با اهمیت فسفر برای گیاه و فراوانی فسفر در خاک، قسمت عمده‌ای از آن در خاک به شکل غیرقابل دسترس می‌باشد. یکی از رویکردهای سازگار با محیط زیست برای فراهمی فسفر در خاک‌ها، استفاده از ریزجانداران حل‌کننده فسفات در سیستم‌های کشاورزی جهت بهبود قابلیت دسترسی فسفر در خاک و غلبه بر محدودیت‌های جذب فسفر توسط گیاهان است (۵).

سازوکار انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول توسط باکتری‌های ریزوسفری حل‌کننده فسفات شامل: کاهش اسیدیته از طریق ترشح اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین مانند اسیدهای مالیک، سوکسینیک، فوماریک، سیتریک، تارتاریک، گلوکونیک و استیک، ترشح برخی ترکیبات محلول مانند سیدروفور، پروتون‌ها، هیدروکسیل‌ها و ترشح آنزیم‌های برون یاخته می‌باشد. هم‌چنین برخی از رایزوباکتری‌های محرک رشد با قابلیت تولید آنزیم فسفاتاز، توانایی معدنی کردن فسفر آلی خاک را دارند (٦). یی و همکاران (۲۰۰۸) بیان داشتند که اگزوپلی‌ساکارید که توانایی نگهداری فسفر را دارد به عنوان یک سازوکار دیگر در انحلال میکروبی فسفات‌های تری‌کلسیم مطرح می‌باشد (۷). در بررسی آزادسازی فسفر در شرایط آزمایشگاهی بیان شده است که میزان آزادسازی فسفر بیش‌تر به گونه ریزجاندار و منابع کربن و نیتروژن و شرایط محیط کشت بستگی دارد (۸). بنابراین، مطابقت نداشتن نتایج آزمایشگاهی آزادسازی فسفر در شرایط درون کشتگاهی با توانایی باکتری در شرایط زراعی می‌تواند به دلیل متفاوت بودن شرایط رشدی از نظر فراهمی ترکیبات و عناصر غذایی مورد نیاز و هم‌چنین دشواری‌های موجود در شرایط ریزوسفری برای فراهمی منابع کربن آلی مناسب در مقایسه با شرایط درون‌کشتگاهی شبیه‌سازی شده باشد (۹). این موضوع اهمیت غربالگری درون‌کشتگاهی جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفر در حضور منابع کربن و نیتروژن مختلف را نشان می‌دهد. یو و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه کاربرد باکتری حل‌کننده فسفر *بورخلدریا سنوسپاسیا*[5] CR318 و تری کلسیم فسفات در گیاه ذرت بیان داشتند که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش میزان فراهمی فسفر و هم‌چنین افزایش ۹۸-۷٤ درصدی شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیک ذرت شد (۱۰).

اسید هیومیک یک ترکیب آلی بوده که در درازمدت از بقایای گیاهی و حیوانی و سلول‌های میکروبی با فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی به دست می آید. اسید هیومیک با اثر مثبتی که بر

1- Plant Growth Promoting Bacteria
2- *Actinoplanes*
3- *Streptomyces*
4- *Micromonospora*
5- *Burkholderia cenocepacia*

قابلیت دسترسی، جذب و فراهمی عناصر غذایی می‌گذارد، سبب بهبود واکنش‌های فیزیولوژیک و افزایش رشد گیاه می‌گردد (۱۱). اسید هیومیک به‌دلیل ویژگی‌های ساختاری منحصر به فرد خود، از طریق گروه‌های عامل خود به عنوان یک کیلیت‌کننده[1] عناصر غذایی نقش کلیدی در افزایش فراهمی عناصر غذایی در ریشه ایفا می‌کند. هم‌چنین اسید هیومیک با تحریک رشد طولی، توسعه جانبی و دسترسی به خاک پیرامون ریشه سبب انتقال بهتر مواد غذایی، سبب کامل شدن فیزیولوژی جذب مواد غذایی در گیاه می‌گردد (۱۲). اسید هیومیک در سیستم خاک-گیاه سبب افزایش رشد و فعال‌سازی جمعیت مؤثر ریزجانداران خاکزی مستقر در رایزوسفر گیاه و هم‌چنین بهبود کارایی مصرف کودهای فسفر می‌گردد (۱۳ و ۱٤). کاربرد همزمان باکتری‌های محرک رشد (*ازتوباکتر*[2]، *باسیلوس سرئوس*[3]، *باسیلوس مگاتریوم*[4]) با اسید هیومیک در گیاه گوجه‌فرنگی سبب بهبود ویژگی‌های رشدی، فیزیولوژیک و عملکردی آن گردید (۱۵). حسین و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی اثر اسید هیومیک و اصلاح‌کننده‌های دیگر خاک همراه با مایه‌زنی باکتری *آلکالیجنس*[5] *AZ9* در گیاه ذرت بیان داشتند که کاربرد تلفیقی سبب افزایش ۱٤ درصدی زیست‌توده گیاه و بهبود ۱۰ درصدی عملکرد دانه گردید (۱٦).

پژوهش‌های مختلف، کاربرد اصلاح‌کننده‌های خاک مانند اسید هیومیک و باکتری‌های محرک رشد گیاه را ابزاری امیدوارکننده برای توسعه کشاورزی پایدار و هم‌چنین بهره‌وری مصرف کودهای فسفاته می‌دانند (۱۷، ۱۸ و ۱۹). بر این اساس هدف از پژوهش حاضر: ۱) غربالگری میزان حل‌کنندگی فسفر جدایه‌های اکتینومایست در محیط‌های کشت مختلف ۲) بررسی اثر افزودن اسید هیومیک در میزان حلالیت فسفر در محیط‌های کشت مختلف ۳) ارزیابی کارایی جدایه منتخب بر شاخص‌های رشدی، فیزیولوژیک و محتوای فسفر ذرت رقم سینگل کراس ۷۰٤ در حضور اسید هیومیک و سطوح کود فسفر می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۲۰ جدایه خالص‌سازی شده که براساس ویژگی‌های ظاهری به اکتینومایست‌ها شباهت داشته و از زیست‌بوم‌های مختلف زراعی و باغی استان گلستان جداسازی و خالص‌سازی شده بودند، برای غربالگری استفاده شد. به‌منظور اطمینان از خالص بودن جدایه‌های باکتریایی، بازکشت دوباره و خالص‌سازی در محیط کشت جامد عصاره مخمر-عصاره مالت آگار ($ISP_2$[6]) (که بر حسب گرم در لیتر شامل: عصاره مالت ۱۰، عصاره مخمر ٤، گلوکز ٤) انجام گرفت. به‌منظور بررسی اثر اسید هیومیک بر حلالیت فسفر در محیط‌های کشت مختلف آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با فاکتورهای: جدایه باکتری (۲۰ جدایه خالص‌سازی شده)، محیط کشت (سه محیط کشت مرسوم حلالیت فسفر)، اسید هیومیک (کاربرد، عدم کاربرد) در سه تکرار طرح‌ریزی گردید. پس از رشد مناسب و یکسان جدایه‌های باکتریایی در محیط پیش‌کشت $ISP_2$، مایه‌زنی به محیط‌های غربالگری حل‌کنندگی فسفر شامل: GA[7] (که بر حسب گرم در لیتر: آرجینین ۱، گلیسرول ۱۲/۵، تری کلسیم فسفات ۵، سدیم کلرید ۱، منیزیم سولفات ۰/۵، سولفات آهن ۰/۰۱، سولفات مس ۰/۰۰۱، سولفات منگنز ۰/۰۰۱، سولفات روی ۰/۰۰۱)، NBRIP[8] (که بر حسب گرم در لیتر: گلوکز

1- Chelating
2- *Azotobacter*
3- *Bacillus cereus*
4-*Bacillus megaterium*
5- *Alcaligenes*

6- International Streptomyces Project
7- Glycerole Arginine
8- National Botanical Research Institutes Phosphate Growth Medium

۱۰، منیزیم کلرید ۵، منیزیم سولفات ۰/۲۵، پتاسیم کلرید ۰/۲، آمونیوم سولفات ۰/۲، کلسیم کلرید ۰/۵، تری کلسیم فسفات ۵) و SMM[1] (که بر حسب گرم در لیتر: گلوکز ۵، آمونیوم نیترات ۲، منیزیم سولفات ۰/۵، پتاسیم کلرید ۰/۵، سولفات آهن ۰/۰۱، تری کلسیم فسفات ۵) به میزان دو درصد حجمی انجام شد. جهت بررسی توانایی حلالیت فسفر جدایه‌های باکتریایی در حضور و عدم حضور اسید هیومیک، از اسید هیومیک پودری با نام تجاری هیومکس[2] (شامل ۸۰ درصد اسید هیومیک و ۲۰ درصد اسید فولویک) استفاده و با غلظت ۰/۰۵ درصد به محیط کشت‌ها اضافه گردید. ارلن‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه (rpm) گرماگذاری شدند. مقدار دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی برداشت و سانتریفیوژ گردید (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه). سپس یک میلی‌لیتر از محلول روشناور با یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات و سه میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفته و سپس مقدار جذب نور در طول موج ٤٧٠ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل BRITE خوانده شد. با توجه به منحنی استاندارد از منبع پتاسیم دی هیدروژن فسفات ($KH_2PO_4$) غلظت فسفر بر حسب میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید (۲۰). پس از انتخاب جدایه برتر برخی ویژگی‌های محرک رشدی آن شامل: توانایی حلالیت فسفر در حضور تری‌کلسیم فسفات (۲۱)، تولید ایندول استیک اسید (۲۲)، تولید اگزوپلی‌ساکارید (۲۰) مورد بررسی قرار گرفت.

**آزمایش گلدانی:** به‌منظور بررسی تأثیر جدایه اکتینومایست منتخب و اثرات متقابل آن با سطوح مختلف فسفر و کاربرد اسیدهیومیک، آزمایش گلدانی تحت شرایط نور و دمای محیط بر روی گیاه ذرت رقم سینگل کراس ٧٠٤ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل: منبع معدنی فسفر در سه سطح (شاهد، ۲۰ کیلوگرم و ٤٠ کیلوگرم فسفر خالص در هکتار)، مایه‌زنی اکتینومایست در دو سطح (مایه‌زنی، عدم مایه‌زنی)، افزودن اسید هیومیک در دو سطح (شاهد و کاربرد ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و کاربرد تلفیقی آن‌ها بود. که تیمارهای آزمایشی به اختصار شامل: $P_0B_0H_0$: عدم کاربرد تیمارهای آزمایشی (شاهد)، $P_1B_0H_0$: کاربرد سطح یک فسفر (۲۰ کیلوگرم فسفر خالص در هکتار)، $P_2B_0H_0$: کاربرد سطح دو فسفر (٤٠ کیلوگرم فسفر خالص در هکتار)، $P_0B_1H_0$: مایه‌زنی باکتری، $P_0B_0H_1$: اسید هیومیک، $P_1B_1H_0$: کاربرد تلفیقی سطح یک فسفر و مایه‌زنی باکتری، $P_2B_1H_0$: کاربرد تلفیقی سطح دو فسفر و مایه‌زنی باکتری، $P_1B_0H_1$: کاربرد تلفیقی سطح یک فسفر و اسید هیومیک، $P_2B_0H_1$: کاربرد تلفیقی سطح دو فسفر و اسید هیومیک، $P_0B_1H_1$: کاربرد تلفیقی مایه‌زنی باکتری و اسید هیومیک، $P_1B_1H_1$: کاربرد تلفیقی سطح یک فسفر (۲۰ کیلوگرم در هکتار)، مایه‌زنی باکتری و اسید هیومیک، $P_2B_1H_1$: کاربرد تلفیقی سطح دو فسفر (٤٠ کیلوگرم در هکتار)، مایه‌زنی باکتری و اسید هیومیک می‌باشد. برای ایجاد شرایط محیطی نزدیک به مزرعه، آزمایش در گلدان‌های دارای هفت کیلوگرم خاک خشک الک شده (٤ میلی‌متر) در شرایط نور و دمای محیط انجام گرفت.

با توجه به اهداف این پژوهش انتخاب خاک مورد نیاز برای انجام آزمایش گلدانی با پایش سطح فسفر قابل جذب پایین آزمون خاک انجام گرفت. خاک مورد استفاده از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری محوطه پردیس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جمع‌آوری و پس از هوا خشک کردن و عبور از الک ۲ میلی‌متری، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن شامل:

1- Synthetic Minimal Medium
2- Humax®

بافت خاک به روش هیدرومتر، اسیدیته به روش عصاره‌گیری گل اشباع، کربن آلی به روش والکی بلاک، فسفر قابل‌جذب به روش اولسن و پتاسیم قابل‌جذب به روش استات آمونیوم اندازه‌گیری شد (۲۳) (جدول ۱).

**جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک استفاده شده.**

**Table 1. Physical and chemical characteristics of the used soil.**

| شن Sand (%) | سیلت Silt (%) | رس Clay (%) | بافت خاک Soil Texture | اسیدیته خاک pH | کربن آلی Organic Carbon (%) | هدایت الکتریکی EC ($dS.m^{-1}$) | فسفر قابل‌جذب $P_{ava}$ ($mg.kg^{-1}$) | پتاسیم قابل‌جذب $K_{ava}$ ($mg.kg^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | 64 | 24 | لوم سیلتی Silty loam | 7.2 | 0.8 | 0.85 | 5.7 | 277 |

برای تامین نیاز غذایی گیاه در طول فصل رشد، براساس آزمون خاک مقادیر ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن خالص و هم‌چنین ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کلرید پتاسیم استفاده شد. هم‌چنین سطوح مورد نظر فسفر از منبع کودی مونوآمونیوم فسفات به خاک گلدان‌ها اضافه شد. اسید هیومیک مورد استفاده در این پژوهش، که به مقدار ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌ترتیب در دو مرحله: ۱) استقرار گیاه (پس از گذشت ده روز از کاشت)، ۲) اواخر رشد رویشی (پس از گذشت ٤٠ روز از کاشت) با فاصله یک ماه، به‌صورت کودآبیاری به خاک گلدان‌ها اضافه شد. مقدار و زمان مصرف اسید هیومیک بر اساس نیاز گیاه و فرمولاسیون ارائه شده کود تجاری، بهینه‌سازی گردید. ضدعفونی سطحی بذرها، ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد و درنهایت ۸ بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. تعداد هفت عدد بذر برای هر گلدان در نظر گرفته شد و سپس بذرها با ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت فعال ($10^{7}$ سلول در هر میلی‌لیتر) آغشته شدند. پس از مدت کوتاهی از رشد، تعداد بوته به چهار عدد کاهش یافت. بررسی تأثیر تیمارهای آزمایشی در مرحله توسعه گیاه (اواخر دوره رشد رویشی) انجام شد. پارامترهای اصلی رشد گیاه شامل: زیست‌توده اندام هوایی و ریشه، ارتفاع گیاه، شاخص کلروفیل با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج مدل (SPAD-502) و هم‌چنین غلظت فسفر در اندام هوایی ثبت گردید (٢٤).

**تجزیه داده‌ها:** آنالیز آماری مقایسه بین تیمارهای مختلف با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD (در سطح احتمال ۵ درصد) استفاده شد. هم‌چنین برای ترسیم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

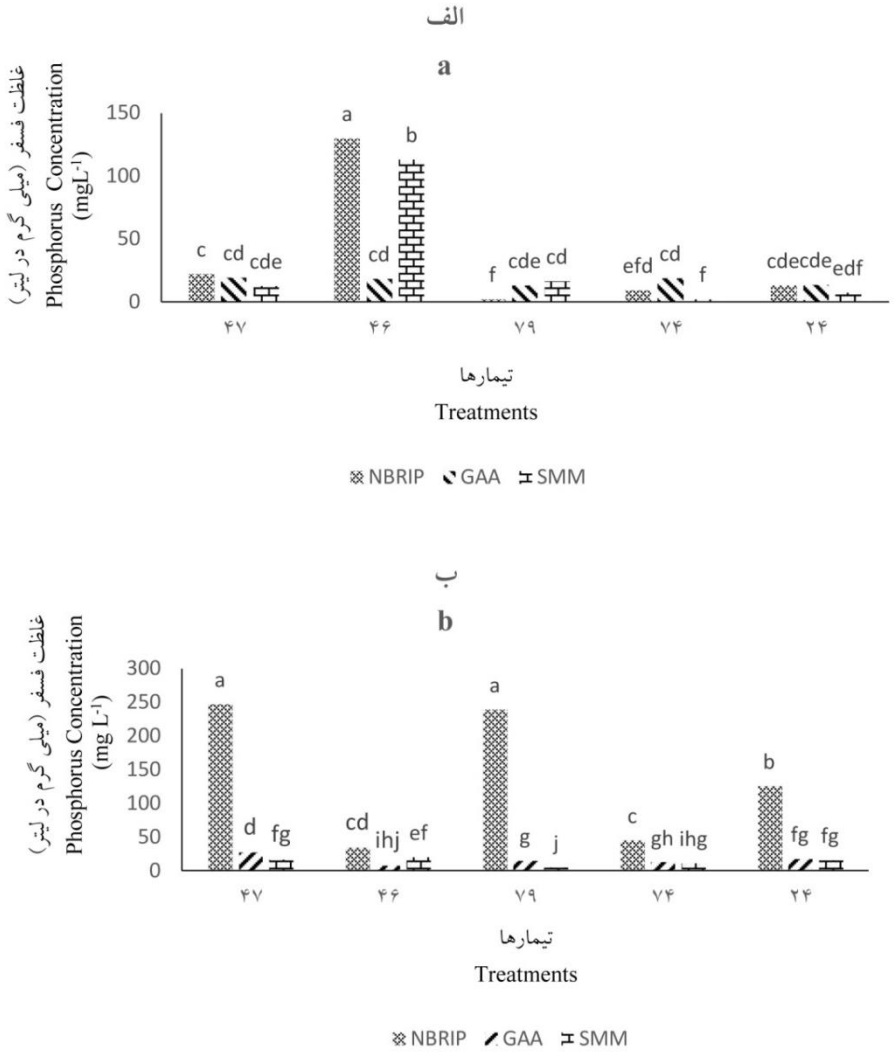
## نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای باکتری × محیط کشت × اسید هیومیک در میزان حلالیت فسفر جدایه‌های باکتریایی در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شد. بر اساس نتایج بیش‌ترین میزان حلالیت فسفر مربوط به تیمار جدایه باکتری ٤٧ همراه با کاربرد محیط کشت NBRIP در حضور اسید هیومیک با میانگین ٢٤٧/٠٥ میلی‌گرم در لیتر بوده که با تیمار جدایه باکتری ۷۹ همراه با کاربرد محیط کشت NBRIP در حضور اسید هیومیک در یک گروه آماری قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده کاربرد اسید هیومیک در شرایط درون کشتگاهی

(*in vitro*) تاثیر مثبتی بر افزایش میزان حلالیت فسفر در بیش‌تر جدایه‌های مورد بررسی داشت (جدول ۲). فرهت و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی سازوکار آزادسازی فسفر جدایه‌های *استرپتومایسس* سویه‌های CTM396، CTM397 در حضور اسید هیومیک گزارش نمودند که افزودن ۰/۰۵ درصد اسید هیومیک به محیط کشت با تأثیر مثبت بر افزایش زیست‌توده میکروبی سبب بهبود حلالیت فسفر جدایه‌های باکتریایی شده که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (۲۵). بررسی نتایج حلالیت فسفر در سه محیط کشت متفاوت NBRIP، SMM، GAA، برای غربالگری نشان داد که آزادسازی در محیط کشت NBRIP از کاریی بیش‌تری برخوردار بوده به طوری‌که حلالیت فسفر در جدایه‌های ٤٧، ٤٦، ٧٩، ٧٤، ٢٤ در محیط کشت NBRIP افزایش قابل‌توجهی از خود نشان داد. بر اساس نتایج، میانگین حلالیت فسفر در سه محیط کشت مورد استفاده GAA، SMM، NBRIP، به‌ترتیب ۱۰/۲۵، ۹/۱٦، ٤۱/۹٦ میلی‌گرم در لیتر در حضور اسید هیومیک بود. به‌طورکلی در شرایط عدم حضور اسید هیومیک میانگین حلالیت فسفر به ترتیب ۹/۲۷، ۱۱/۲۹، ۱۵/۰۳ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌های کشت GAA، SMM، NBRIP، ثبت گردید (جدول ۲). ماهیت و نوع منابع کربن و نیتروژن موجود در محیط‌های کشت باکتریایی، بر توانایی آزادسازی فسفر و تولید اسیدهای آلی توسط باکتری مؤثر است (٢٦). بررسی‌ها نشان داده است که در میان منابع کربن زایلوز، گلوکز و مانیتول، گلوکز منبع مناسب‌تری برای آزادسازی فسفر جدایه‌های باکتریایی بوده، هم‌چنین سولفات آمونیوم در میان سایر منابع مختلف نیتروژن موجود در محیط کشت‌های مرسوم آزادسازی فسفر شامل اگزالات آمونیوم، کلرید آمونیوم و استات آمونیوم، به عنوان منبع نیتروژن بهینه عنوان شده است (۲۵). بر این اساس می‌توان گفت که کارایی بهتر حلالیت فسفر جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت NBRIP در مقایسه با دو محیط کشت دیگر، احتمالاً به دلیل دارا بودن ترکیبات کربن و نیتروژن مناسب‌تر و با قابلیت استفاده بهتر باشد. بررسی نتایج غربالگری حلالیت فسفر جدایه‌های اکتینومایست در شرایط درون کشتگاهی (in vitro) نشان داد که جدایه‌های ٤٧، ٤٦، ٧٩، ٧٤، ٢٤ از برتری نسبی در مقایسه با سایر جدایه‌ها برخوردارند. نتایج نشان داد که کاربرد اسید هیومیک سبب افزایش میزان حلالیت فسفر در جدایه‌های ٤٧، ٧٩، ٧٤، ٢٤ گردید. به طوری‌که به‌ترتیب افزایش ۱۱/۱۲، ۱۱۸/۰٦، ٤/٧٦، ۹/٦۹ برابری حلالیت فسفر نسبت به شرایط بدون اسید هیومیک در محیط کشت NBRIP جدایه‌های مذکور ثبت گردید (شکل ۱ الف و ب). این موضوع را می‌توان به افزایش فراهمی و توانایی جدایه‌ها برای دسترسی به عناصر غذایی محیط کشت در حضور اسید هیومیک نسبت داد. فئوکیستوفا و همکاران (۲۰۲۲) بیان داشتند که اثرات محرک رشدی مواد هیومیک به طور آشکار در فازهای رشد باکتری به ویژه فاز سکون[1] مشاهده شد. در فاز سکون، کمبود عناصر غذایی و تولید مواد سمی، رشد جدایه‌های باکتریایی را کاهش می‌دهد. سلول‌های باکتری مواد هیومیکی را روی سطح خود جذب نموده (۲۷) و با تأثیر بر نفوذپذیری غشای خارجی (۲۸) توانایی باکتری برای جذب عناصر غذایی از محیط کشت را افزایش می‌دهند (۲۹). از سوی دیگر، مواد هیومیک می‌توانند ریزجاندران را از اثرات ترکیبات سمی محافظت نمایند (۲۷). یوآن و همکاران (۲۰۲۲) بیان داشتند که اسید هیومیک از طریق اثر مثبتی که بر جمعیت جوامع میکروبی داشته، موجب بهبود فعالیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌گردد (۳۰). بررسی نتایج نشان داد که افزودن اسید هیومیک سبب کاهش میزان حلالیت فسفر در جدایه ٤٦ در هر سه محیط کشت گردید. دلایل کاهش حلالیت فسفر در حضور اسید هیومیک جدایه ٤٦ روشن نیست. اما به نظر می‌رسد، این مساله می‌تواند ناشی از دو عامل باشد: ۱) تغییر pH محیط؛

1- Stationary phase

به‌طوری‌که pH محیط به بیرون از محدوده رشد بهینه جدایه تغییر نماید و ۲) غلظت اسید هیومیک استفاده شده در محیط اثر بازدارنده رشد و در نهایت کاهش حل‌کنندگی فسفات را در پی داشته باشد. بر اساس نتایج حاصل از بررسی حلالیت فسفر در شرایط درون‌کشتگاهی در این پژوهش، جدایه ٤٧ به عنوان جدایه برتر حل‌کننده فسفر انتخاب و به‌منظور ارزیابی کارایی آن در قالب انجام آزمون گلدانی، برخی ویژگی‌های محرک رشد گیاه آن به صورت کیفی مورد بررسی قرار گرفت. که عبارتست از: توانایی مطلوب حلالیت فسفر در حضور تری کلسیم فسفات، توانایی تولید مطلوب اگزوپلی‌ساکارید برون‌یاخته و هم‌چنین توانایی تولید متوسط ایندول استیک اسید (IAA)[1] را از خود نشان داد. بر اساس نتایج توالی‌یابی 16S rRNA جدایه ٤٧ دارای بیش‌ترین همولوژی با جدایه *استرپتومایسس کارترئوسیس* بوده و با شماره دسترسی KJ152149 در پایگاه NCBI ثبت شده است.




**شکل ۱- تأثیر محیط‌های کشت و اسید هیومیک بر غلظت فسفر محلول جدایه‌های باکتریایی برتر. الف) بدون اسید هیومیک. ب) با اسید هیومیک.**

**Figure 1. The effect of culture media and humic acid on soluble phosphorus concentration of superior bacterial isolates. a) with humic acid, b) without humic acid.**

1- Indole-3- Acetic Acid

جدول ۲- اثر محیط‌های کشت، اسید هیومیک و مایه‌زنی جدایه‌ها بر میزان غلظت فسفر محلول (میلی‌گرم در لیتر).

**Table 2. The effect of culture media, humic acid and isolated strain inoculation on soluble phosphorus concentration (mg $L^{-1}$).**

| جدایه Isolated strains | اسید هیومیک Humic acid | محیط‌های کشت culture media | غلظت فسفر Phosphorus Concentration (mg $L^{-1}$) | جدایه Isolated strains | اسید هیومیک Humic acid | محیط‌های کشت culture media | غلظت فسفر Phosphorus Concentration (mg $L^{-1}$) | جدایه Isolated strains | اسید هیومیک Humic acid | محیط‌های کشت culture media | غلظت فسفر Phosphorus Concentration (mg $L^{-1}$) | جدایه Isolated strains | اسید هیومیک Humic acid | محیط‌های کشت culture media | غلظت فسفر Phosphorus Concentration (mg $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 47 | با اسید هیومیک | GAA | 26.79 cd | 12 | با اسید هیومیک | GAA | 12.07 cd | 91 | با اسید هیومیک | GAA | 2.85 d | 65 | با اسید هیومیک | GAA | 14.18 cd |
| | with humic acid | NBRIP | 247.05 a | | with humic acid | NBRIP | 23.72 cd | | with humic acid | NBRIP | | | with humic acid | NBRIP | 1.94 d |
| | | SMM | 16.25 cd | | | SMM | 8.39 d | | | SMM | 17.14 cd | | | SMM | 1.56 d |
| | بدون اسید هیومیک | GAA | 19.04 cd | | بدون اسید هیومیک | GAA | 1.57 d | | بدون اسید هیومیک | GAA | 5.8 d | | بدون اسید هیومیک | GAA | 1.23 d |
| | without humic acid | NBRIP | 22.2 cd | | without humic acid | NBRIP | 11.13 cd | | without humic acid | NBRIP | 23.82 cd | | without humic acid | NBRIP | 2.3 d |
| | | SMM | 12.5 cd | | | SMM | 0 | | | SMM | 10.3 cd | | | SMM | 0.55 d |
| 24 | با اسید هیومیک | GAA | 16.88 cd | 35 | با اسید هیومیک | GAA | 2.76 d | 13 | با اسید هیومیک | GAA | 6.7 d | 44 | با اسید هیومیک | GAA | 0.64 d |
| | with humic acid | NBRIP | 125.1 b | | with humic acid | NBRIP | 7.58 d | | with humic acid | NBRIP | 1.56 d | | with humic acid | NBRIP | 10.61 cd |
| | | SMM | 15.25 cd | | | SMM | 1.89 d | | | SMM | 3.82 d | | | SMM | 6.09 d |
| | بدون اسید هیومیک | GAA | 13.49 cd | | بدون اسید هیومیک | GAA | 3.03 d | | بدون اسید هیومیک | GAA | 4.61 d | | بدون اسید هیومیک | GAA | 3.64 d |
| | without humic acid | NBRIP | 12.9 cd | | without humic acid | NBRIP | 1.98 d | | without humic acid | NBRIP | 0.98 d | | without humic acid | NBRIP | 19.79 cd |
| | | SMM | 7.49 d | | | SMM | 1.95 d | | | SMM | 1.46 d | | | SMM | 4.68 d |
| 72 | با اسید هیومیک | GAA | 20.71 cd | 74 | با اسید هیومیک | GAA | 12.16 cd | 15 | با اسید هیومیک | GAA | 0 | 39 | با اسید هیومیک | GAA | 15.95 cd |
| | | NBRIP | 15.95 cd | | | NBRIP | 44.51 c | | | NBRIP | 5.39 d | | | NBRIP | 3.9 d |
| | with humic acid | SMM | 3.24 d | | with humic acid | SMM | 11.24 cd | | with humic acid | SMM | 12.75 cd | | with humic acid | SMM | 9.01 cd |
| | بدون اسید هیومیک | GAA | 7.73 d | | بدون اسید هیومیک | GAA | 18.72 cd | | بدون اسید هیومیک | GAA | 1.07 d | | بدون اسید هیومیک | GAA | 20.74 cd |
| | without humic acid | NBRIP | 3.24 d | | without humic acid | NBRIP | 9.35 cd | | without humic acid | NBRIP | 11.45 cd | | without humic acid | NBRIP | 1.61 d |
| | | SMM | 12.79 cd | | | SMM | 2.08 d | | | SMM | 0 | | | SMM | 7.35 d |

**ادامه جدول ۲-**

**Continue Table 2.**

| جدایه Isolated strains | اسید هیومیک Humic acid | محیط‌های کشت culture media | غلظت فسفر Phosphorus Concentration (mg $L^{-1}$) | جدایه Isolated strains | اسید هیومیک Humic acid | محیط‌های کشت culture media | غلظت فسفر Phosphorus Concentration (mg $L^{-1}$) | جدایه Isolated strains | اسید هیومیک Humic acid | محیط‌های کشت culture media | غلظت فسفر Phosphorus Concentration (mg $L^{-1}$) | جدایه Isolated strains | اسید هیومیک Humic acid | محیط‌های کشت culture media | غلظت فسفر Phosphorus Concentration (mg $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 68 | با اسید هیومیک | GAA | $6.75^{d}$ | 27 | با اسید هیومیک | GAA | $4.35^{d}$ | 41 | با اسید هیومیک | GAA | $6.96^{d}$ | 42 | با اسید هیومیک | GAA | $17.37^{cd}$ |
| | | NBRIP | $33.48^{cd}$ | | | NBRIP | $14.68^{cd}$ | | | NBRIP | $26.25^{cd}$ | | | NBRIP | $2.58^{d}$ |
| | with humic acid | SMM | $12.25^{cd}$ | | with humic acid | SMM | $25.61^{cd}$ | | with humic acid | SMM | $6.1^{d}$ | | with humic acid | SMM | $1.28^{d}$ |
| | بدون اسید هیومیک | GAA | 0 | | بدون اسید هیومیک | GAA | $22.27^{cd}$ | | بدون اسید هیومیک | GAA | $4.09^{d}$ | | بدون اسید هیومیک | GAA | $7.85^{d}$ |
| | without humic acid | NBRIP | $16.86^{cd}$ | | without humic acid | NBRIP | $6.46^{d}$ | | without humic acid | NBRIP | $9.15^{cd}$ | | without humic acid | NBRIP | $1.01^{d}$ |
| | | SMM | $1.75^{d}$ | | | SMM | $14.42^{cd}$ | | | SMM | $9.09^{cd}$ | | | SMM | $1.8^{d}$ |
| 99 | با اسید هیومیک | GAA | $14.69^{cd}$ | 46 | با اسید هیومیک | GAA | $7^{d}$ | 18 | با اسید هیومیک | GAA | $2.2^{d}$ | 79 | با اسید هیومیک | GAA | $14.15^{cd}$ |
| | | NBRIP | $1.01^{d}$ | | | NBRIP | $34.21^{cd}$ | | | NBRIP | $1.28^{d}$ | | | NBRIP | $238.56^{a}$ |
| | with humic acid | SMM | $4.32^{d}$ | | with humic acid | SMM | $19.73^{cd}$ | | with humic acid | SMM | $2.6^{d}$ | | with humic acid | SMM | $4.83^{d}$ |
| | بدون اسید هیومیک | GAA | $15.51^{cd}$ | | بدون اسید هیومیک | GAA | $18.5^{cd}$ | | بدون اسید هیومیک | GAA | $3.75^{d}$ | | بدون اسید هیومیک | GAA | $12.82^{cd}$ |
| | without humic acid | NBRIP | $13.48^{cd}$ | | without humic acid | NBRIP | $129.64^{b}$ | | without humic acid | NBRIP | $1.41^{d}$ | | without humic acid | NBRIP | $2.02^{d}$ |
| | | SMM | $6.16^{d}$ | | | SMM | $113.05^{b}$ | | | SMM | $2.17^{d}$ | | | SMM | $16.36^{cd}$ |

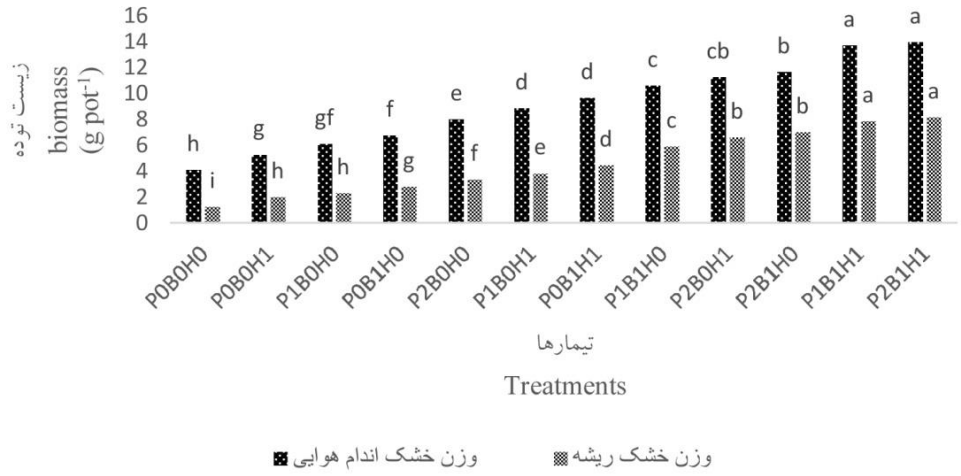
**جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های رشدی و محتوای فسفر گیاه.**

**Table 3. Variance analysis of the effect of experimental treatments on growth indices and plant phosphorus content.**

| ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant height (cm) | شاخص کلروفیل Chlorophyll Index | محتوای فسفر (درصد) Phosphorus content (٪) | وزن خشک ریشه (گرم در گلدان) Root dry weight (g/pot) | وزن خشک اندام هوایی (گرم در گلدان) Dry weight of aerial parts (g/pot) | درجه آزادی df | منابع تغییرات S.O.V |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.78 ns | 1.35 ns | 0.0006 ns | 41.30** | 71.89** | 2 | فسفر Phosphorus |
| 3.24 ns | 21.91 ns | 0.001* | 71** | 129.77** | 1 | باکتری Bacteria |
| 0.02 ns | 39.96* | 0.00004 ns | 26.52** | 60.08** | 1 | اسید هیومیک Humic acid |
| 0.66 ns | 22.41 ns | 0.001** | 2.58** | 1.86** | 2 | باکتری × فسفر Bacteria × Phosphorus |
| 11.48** | 6.88 ns | 0.001** | 0.77** | 0.69 ns | 2 | فسفر × اسید هیومیک Humic acid × Phosphorus |
| 56.25** | 231.09** | 0.001** | 0.11 ns | 0.28 ns | 1 | باکتری × اسید هیومیک Bacteria × Humic acid |
| 0.94 ns | 65.08** | 0.002** | 2.01** | 1.34** | 2 | باکتری × اسید هیومیک × فسفر Bacteria × Humic acid × Phosphorus |
| 0.92 | 8.84 | 0.0002 | 0.07 | 0.24 | 24 | خطا Error |
| 3.13 | 10.83 | 8.19 | 5.87 | 5.43 | | ضریب تغییرات (٪) CV (%) |

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، ns عدم معنی‌داری

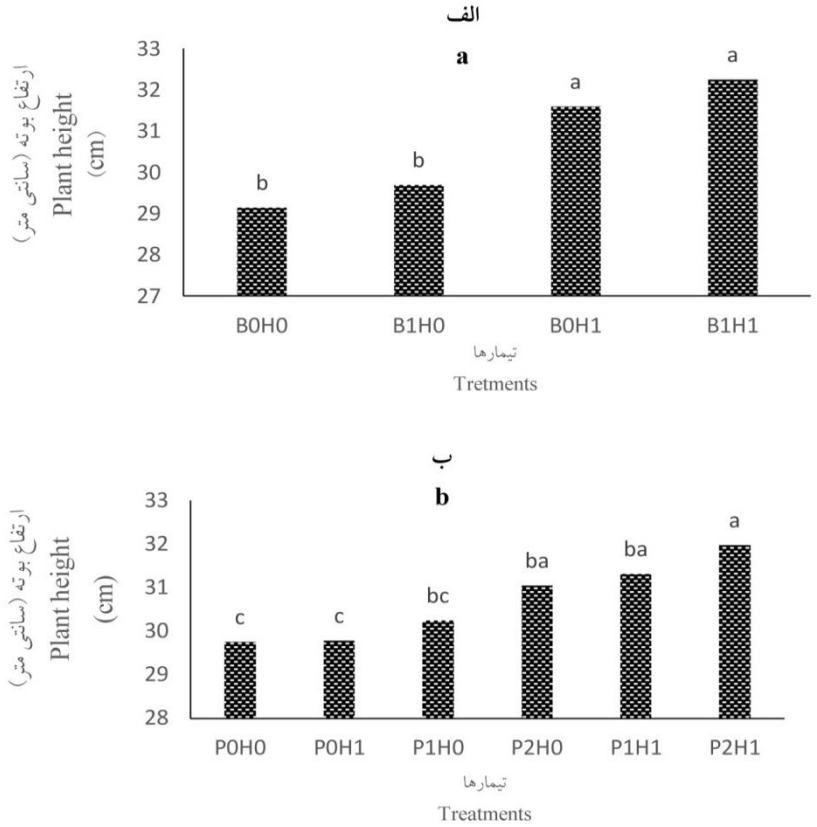
** Significant at 1%, * significant at 5%, ns non-significant




**شکل ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان زیست‌توده اندام هوایی و ریشه.**

**Figure 2. The effect of experimental treatments on the amount of shoot and root biomass.**

**زیست‌توده اندام هوایی و ریشه:** بر اساس نتایج تجزیه واریانس تیمارهای اثر متقابل باکتری × اسید هیومیک × فسفر بر شاخص‌های رشدی به جز ارتفاع بوته در گیاه ذرت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیش‌ترین مقدار زیست‌توده اندام هوایی (۱۳/۹۷ گرم در گلدان) و ریشه (۸/۲ گرم در گلدان) مربوط به تیمار کاربرد تلفیقی سطح دو فسفر (۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به همراه اسید هیومیک و مایه‌زنی *استرپتومایسس* می‌باشد (شکل ۲). که به‌ترتیب سبب افزایش ۷۴/۱، ۲۳/۹ درصدی زیست‌توده اندام هوایی در مقایسه با تیمار کاربرد تلفیقی سطح دو فسفر × اسید هیومیک و تیمار سطح بالای فسفر گردید. هم‌چنین تیمار کاربرد تلفیقی بهینه ($P_2B_1H_1$) به ترتیب سبب افزایش ۱۴۴/۰۴، ۲۴/۰۵ درصدی زیست‌توده ریشه در مقایسه با تیمارهای کاربرد سطح دو فسفر × اسید هیومیک و سطح دوم فسفر گردید (شکل ۲). این مسأله نشان‌دهنده تأثیر مثبت مایه‌زنی *استرپتومایسس* در بهبود کارایی کاربرد کود فسفر و اسید هیومیک می‌باشد. گزارش شده است که مایه‌زنی باکتری به واسطه دارا بودن ویژگی‌های محرک رشدی آزادسازی عناصر غذایی و تولید هورمون‌های گیاهی سبب بهبود فراهمی عناصر غذایی و افزایش زیست‌توده گیاه می‌گردد (۳۱). یوآن و همکاران (۲۰۲۲) در پژوهشی بر روی کاربرد باهمِ اسید هیومیک و کود فسفر بیان داشتند که اسید هیومیک به‌واسطه تأثیر مثبتی که در بهبود شاخص‌های مورفولوژیک و جذب عناصر غذایی گیاه دارد به‌طور قابل‌توجهی سبب افزایش زیست‌توده ریشه و اندام هوایی می‌گردد. هم‌چنین افزایش تراکم ریشه در نتیجه کاربرد تلفیقی کود فسفر و اسید هیومیک از جمله اثرات مثبت کاربرد هم‌زمان آن‌ها عنوان شده است (۳۰).



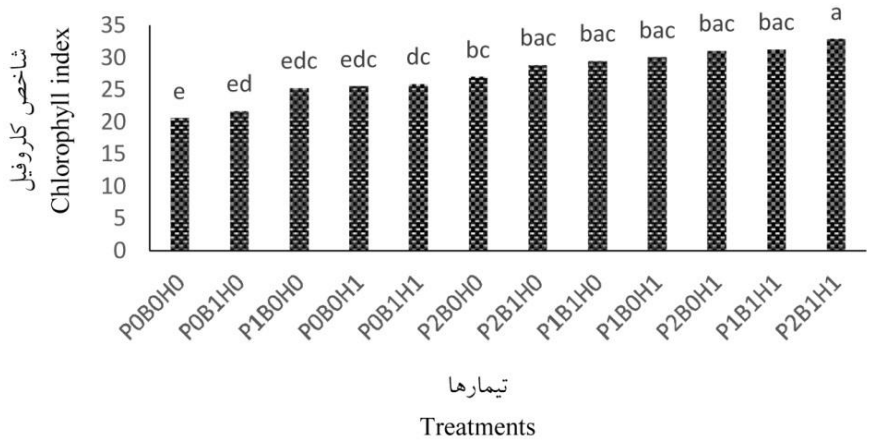

**شکل ۳- الف) اثر متقابل باکتری و اسید هیومیک ب) فسفر و اسید هیومیک بر ارتفاع بوته.**

**Figure 3. a) Interaction effect of bacterium and humic. b) phosphorus and humic acid on plant height.**

**ارتفاع بوته:** نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر ارتفاع بوته بیانگر اثر معنی‌دار تیمارهای کاربرد تلفیقی باکتری × اسید هیومیک کود فسفر × اسید هیومیک در سطح آماری یک درصد بود (جدول ۳). بررسی نتایج تیمارهای کاربرد تلفیقی باکتری × اسید هیومیک نشان داد که بیش‌ترین اندازه ارتفاع بوته (۳۲/۲٦ سانتی‌متر) در تیمار تلفیقی مایه‌زنی باکتری و اسید هیومیک مشاهده شد که با افزایش ۱۰ درصدی تفاوت آماری معنی‌داری با شاهد داشت. هم‌چنین لازم به ذکر است که تیمار بهینه ($B_1H_1$) با تیمار کاربرد اسید هیومیک در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل ۳- الف). احمد و همکاران (۲۰۱٦) بیان داشتند کاربرد باهمِ اسید هیومیک و باکتری‌های محرک رشد به‌دلیل فعالیت و نقش هورمونی اسید هیومیک در متابولیسم گیاه و هم‌چنین بهبود کارایی تأثیر آن پس از مایه‌زنی با باکتری سبب افزایش ارتفاع بوته و سایر پارامترهای رشدی مرتبط می‌گردد (۳۲).

کاربرد تیمارهای تلفیقی کود فسفر × اسید هیومیک سبب افزایش غیرمعنی‌دار ارتفاع بوته در مقایسه با کاربردهای کود فسفر به تنهایی شد. بررسی نتایج نشان داد که تیمار تلفیقی کاربرد سطح دو فسفر + اسید هیومیک افزایش معنی‌دار (۷/٤ درصد) در مقایسه با شاهد داشت (شکل ۳- ب). یوآن و همکاران (۲۰۲۲) بیان داشتند که کاربرد کودهای فسفر به همراه اسید هیومیک موجب تأثیر بهتر فسفر در افزایش شاخص‌های ارتفاع بوته، زیست‌توده ریشه و دسترسی به خاک پیرامون ریشه شده و این مسأله ناشی از نقش کیلیت‌کنندگی عناصر و بهبود فراهمی آن برای گیاه به واسطه کاربرد اسید هیومیک می‌باشد (۳۰).

**شاخص کلروفیل:** بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای متقابل باکتری × اسید هیومیک × فسفر بر مقدار شاخص کلروفیل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج نشان داد که تیمار کاربرد تلفیقی مایه‌زنی باکتری و سطح دوم فسفر به‌همراه اسید هیومیک بیش‌ترین میزان شاخص کلروفیل (۳۲/۸۷) را به ثبت رسانید که با افزایش ۲۱/۷ درصدی اختلاف آماری معنی‌داری با تیمار سطح دوم فسفر داشت (شکل ٤). در این راستا فرهت و همکاران (۲۰۱۵) بیان داشتند که کاربرد اسید هیومیک به واسطه نقش مثبتی که بر فعالیت جمعیت میکروبی مؤثر *استرپتومایسس*‌های محرک رشد دارد سبب افزایش کارایی مایه‌زنی باکتری و اثرات محرک رشدی آن شده و از این طریق بر شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه به‌ویژه شاخص کلروفیل تأثیر مناسبی می‌گذارد (۲۵). هم‌چنین عنوان شده است که کاربرد با هم اکتینومایست و اسید هیومیک با ایجاد اثر هم‌افزایی مثبت در فراهمی عناصر غذایی و هم‌چنین افزایش شاخص‌های رشد سبب بهبود محتوای کلروفیل گیاه می‌گردد (۳۳). شاخص کلروفیل یکی از شاخص‌های مؤثر در فعالیت فتوسنتزی بوده که میزان آن وابسته به فراهمی عناصر غذایی و هم‌چنین تکمیل شدن چرخه فیزیولوژیک رشد گیاه می‌باشد (۳٤). کاربرد اسید هیومیک سبب بهبود اثر تیمارهای مایه‌زنی باکتری و کاربرد سطوح کود فسفر بر شاخص کلروفیل گیاه در این پژوهش گردید (شکل ٤). به‌طور کلی کاربرد اسید هیومیک سبب افزایش شاخص کلروفیل و فعالیت فتوسنتزی در گیاه می‌شود. این موضوع را می‌توان به افزایش فراهمی عناصر غذایی و بهبود شاخص‌های رشد گیاه نسبت داد (۲٦). احمد و همکاران (۲۰۱٦) در پژوهشی بیان داشتند که کاربرد هم‌زمان اسید هیومیک و سطوح مختلف کود فسفر سبب افزایش شاخص کلروفیل گردید (۳۲).

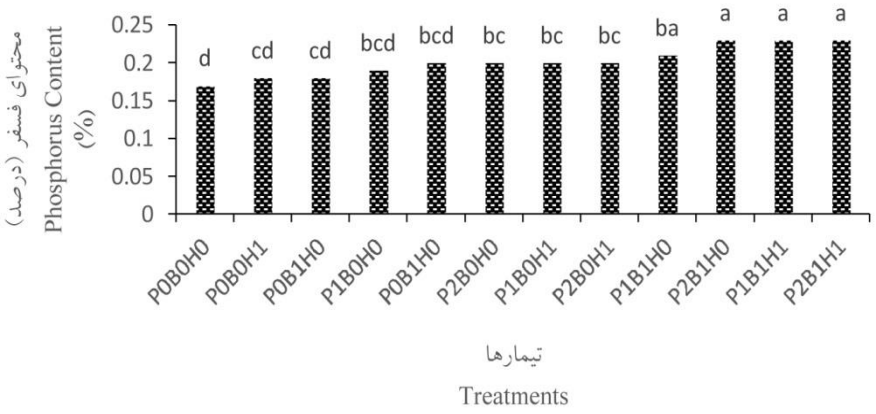



**شکل ٤- اثر متقابل باکتری و اسید هیومیک و فسفر بر شاخص کلروفیل.**

**Figure 4. Interaction effect of bacterium, humic acid and phosphorus on chlorophyll index.**

**محتوای فسفر گیاه:** نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای آزمایشی بر محتوای فسفر گیاه نشان داد که اثر متقابل تیمار باکتری × اسید هیومیک × فسفر در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). براساس نتایج مقایسه میانگین بیش‌ترین مقدار محتوای فسفر مربوط به تیمار کاربرد تلفیقی مایه‌زنی باکتری و سطح دوم فسفر به همراه اسید هیومیک با میانگین ۰/۲۳ درصد ثبت شد که با افزایش ۳۵ درصدی، اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به شاهد داشت (شکل ۵). که این موضوع نشان‌دهنده کارایی فراهمی کود فسفر در نتیجه استفاده از مایه‌زنی باکتری و کاربرد اسید هیومیک می‌باشد. با وجود زیاد بودن غلظت فسفر کل در خاک‌های کشاورزی ولی در عین‌حال غلظت فسفر فراهم برای گیاه در خاک کم می‌باشد. استفاده از کودهای شیمیایی فسفاته از متداول‌ترین روش‌ها برای جبران کمبود فسفر بوده. اما مطالعات نشان داده است که کم‌تر از ۲۰ درصد کود فسفر مصرفی توسط گیاه قابل‌جذب بوده و بقیه آن در خاک تثبیت و یا تغییر شکل یافته و به شکل غیرقابل‌جذب در می‌آید و از کارایی پایینی برای تامین فسفر گیاه برخوردار هستند (۳۵). ریزجاندارانی حل‌کننده فسفات، از طریق معدنی کردن فسفر آلی و انحلال فسفات‌های تثبیت شده، سبب بهبود فراهمی فسفر برای گیاهان می‌شوند (۳۳). نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای تلفیقی سطح یک و دو کود فسفر × مایه‌زنی باکتری × اسید هیومیک به ترتیب سبب افزایش ۱۵، ۲۱ درصدی محتوای فسفر گیاه در مقایسه با تیمارهای کاربرد سطح یک و دو کود فسفر به تنهایی گردید. که این موضوع نشان‌دهنده کارایی فراهمی کود فسفر در نتیجه استفاده از مایه‌زنی باکتری و کاربرد اسید هیومیک می‌باشد (شکل ۵). سازوکارهای انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول توسط باکتری‌های ریزوسفری حل‌کننده فسفات شامل کاهش pH از طریق ترشح اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین مانند: مالیک، سوکسینیک، فوماریک، سیتریک، تارتاریک، گلوکونیک و استیک، ترشح سیدروفور، پروتون‌ها و ترشح آنزیم‌های برون‌یاخته می‌باشد. هم‌چنین برخی از ریزوباکتری‌های محرک رشد با قابلیت تولید آنزیم فسفاتاز، توانایی معدنی کردن فسفر آلی خاک را دارا می‌باشند (۳٦). اسید هیومیک یک ماده آلی بوده و می‌تواند سبب افزودن کربن آلی و سایر ترکیبات آلی مانند فسفر آلی به

خاک گردد. بنابراین به نظر می‌رسد اسید هیومیک نه تنها توانسته سبب تحریک رشد اکتینوباکتری مورد استفاده در این پژوهش گردد، بلکه به دلیل دارا بودن فعالیت فسفاتازی و فیتازی جدایه مورد استفاده (۳۷ و ۳۸) اسید هیومیک می‌تواند از جمله دلایل دیگر تأثیر مثبت تیمارهای کاربرد تلفیقی مایه‌زنی باکتری × اسید هیومیک در افزایش مقدار محتوی فسفر گیاه باشد. کوزولینو و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی تأثیر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بیان داشتند که مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش میزان فسفر گیاه نسبت به گیاهان مایه‌زنی نشده گردید (۳۱). هم‌چنین گفته شده است که استفاده از اسید هیومیک به‌صورت کاربرد تلفیقی با کود فسفر به واسطه اثر مثبت اسید هیومیک بر هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد گیاه و هم‌چنین خاصیت کیلیت‌کنندگی و فراهمی عناصر غذایی، سبب افزایش محتوای فسفر در اندام هوایی گیاه می‌گردد (۳۰).




**شکل ۵- اثر متقابل باکتری و اسید هیومیک و فسفر بر میزان محتوای فسفر گیاه.**

**Figure 5. Interaction effect of bacterium, humic acid and phosphorus on phosphorus content.**

## نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج غربالگری جدایه‌های اکتینومایست در محیط‌های کشت مختلف و متداول سنجش آزادسازی فسفر همراه با افزودن اسید هیومیک، جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت NBRIP در مقایسه با محیط‌های کشت SMM و GA حلالیت فسفر بیش‌تری از خود نشان دادند. توانایی آزادسازی فسفر در جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش متاثر از ترکیبات محیط کشت بوده و به نظر می‌رسد به‌دلیل وجود منابع کربن و نیتروژن مناسب‌تر در محیط کشت NBRIP توانایی حل‌کنندگی فسفر در جدایه‌های اکتینومایست، بیش‌تر می‌باشد. مایه‌زنی باکتری و افزودن اسید هیومیک در سطح دو فسفر (٤٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ($P_2B_1H_1$) به خاک سبب افزایش زیست‌توده اندام هوایی و ریشه، ارتفاع گیاه، محتوای کلروفیل برگ و محتوای فسفر در بافت گیاه گردید. این موضوع بیانگر اثرات مثبت کاربرد هم‌زمان تیمارهای یادشده و تأثیر هم‌افزایی آن‌ها بر پارامترهای رشدی، فیزیولوژی و غلظت فسفر گیاه دارد. هم‌چنین می‌توان گفت که بهبود پارامترهای رشدی گیاه ممکن است به واسطه فراهمی فسفر مطلوب در نتیجه مایه‌زنی جدایه اکتینومایست با ویژگی آزادسازی فسفر برتر و هم‌چنین اسید هیومیک به‌عنوان کی‌لیت‌کننده مناسب عناصر غذایی بوده باشد. بر اساس نتایج این

پژوهش، مایه‌زنی اکتینومایست و کاربرد باهم آن با اسید هیومیک و تیمار مطلوب کود فسفر می‌تواند به‌عنوان یک روش بهینه در بهبود شاخص‌های رشدی و هم‌چنین افزایش فراهمی و کارایی فسفر باشد. هر چند که آزمایش‌های مزرعه‌ای برای اثبات کارایی آن‌ها ضروری است.

## منابع


1. Han, H. S., & Lee, K. D. (2006). Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil and Environment*, 52 (3), 130-136. **doi: 10.17221/3356-PSE.**
2. Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14 (1), 4. **doi:10.1016/ j.tplants. 2008.10.004.**
3. Jog, R., Pandya, M., & Nareshkumar, G., Rajkumar, S. (2014). Mechanism of phosphate solubilisation and antifungal activity of Streptomyces sp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Journal of Microbiology*, 160 (4), 778-788. **doi: 10.1099/mic.0.074146-0.**
4. Ahemad, M., Zaidi, A., Khan, M. S., & Oves, M. (2009). Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microbes- Anoverview. Phosphate Solubilising Microbes for Crop Improvement. *Nova Science Publisher Inc*, Pp: 1-14.
5. An, X., Liu, J., Liu, X., Ma, C., & Zhang, Q. (2022). Optimizing phosphorus application rate and the mixed inoculation of Arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria can improve the phosphatase activity and organic acid content in alfalfa soil. *Journal of Sustainability*, 14 (18), 11342. **doi: 10.3390/su141811342.**
6. Saravanan, D., Radhakrishnan, M., & Balagurunathan, R. (2016). Isolation of plant growth promoting substance producing bacteria from Niligiri hills with special reference to phosphatase enzyme. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8 (2), 698-703. **doi: 10.3389/ fsufs.2022.903114.**
7. Yi, Y., Huang, W., & Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1059-1065. **doi: 10.1007/s11274-007-9575-4.**
8. Whitelaw, M. (2000). Growth promotion of plant inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, 99-15. **doi: 10.1016/ S0065-2113(08)60948-7.**
9. Richardson, A. E. (2007). Making microorganisms mobilize soil phosphorus. p 85-90. In Velázquez E., Rodríguez-Barrueco, C, First international meeting on microbial phosphate solubilization, Part of the book series: *Developments in Plant and Soil Sciences*. **doi: 10.1007/ 978-1-4020-5765-6_10.**
10. You, M., Fang, S., MacDonald, J., Xu, J., & Yuan, Z. C. (2020). Isolation and characterization of Burkholderia cenocepacia CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth. *Journal of Microbiological Research*, 233 (1), 126-395. **doi: 10.1016/ j.micres.2019.126395.**
11. Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Journal of Microbiological Researc*, 169 (1), 30-39. **doi:10.1016/j.micres.2013.09.009.**
12. Yang, F., Sui, L., Tang, C., Li, J., Cheng, K., & Xue, Q. (2021). Sustainable advances on phosphorus utilization in soil via addition of biochar and humic substances. *Journal of Science of the Total Environment*, 768, 145106. **doi: 10.1016/ j.scitotenv. 2021.145106.**
13. Arif, I., Batool, M., & Schenk, P. M. (2020). Plant microbiome engineering: expected benefits for improved crop growth and resilience. *Trends in Biotechnology*, 38 (12), 1385-1396. **doi: 10.1016/j.tibtech.2020.04.015.**

14. Izhar Shafi, M., Adnan, M., Fahad, S., Wahid, F., Khan, A., Yue, Z., Danish, S., Zafar-ul-Hye, M., Brtnicky, M., & Datta, R. (2020). Application of single superphosphate with humic acid improves the growth, yield and phosphorus uptake of wheat (Triticum aestivum L.) in calcareous soil. *Journal of Agronomy*, 10 (9), 12-24. **doi: 10. 3390/agronomy10091224.**
15. Abdel-Monaim, M. F., Abdel-Gaid, M. A., & El-Morsy, M. E. M. A. (2012). Efficacy of Rhizobacteria and humic acid for controlling Fusarium wilt disease and improvement of plant growth, quantitative and qualitative parameters in tomato. *International Journal of Phytopathology*. 1 (1), 39-48. **doi: 10.33687/ phytopath. 001.01.0014.**
16. Hussain, A., Ahmad, M., Mumtaz, M. Z., Nazli, F., Farooqi, M. A., Khalid, I., & Arshad, H. (2019). Impact of integrated use of enriched compost, biochar, humic acid and Alcaligenes sp. AZ9 on maize productivity and soil biological attributes in natural field conditions. *Italian Journal of Agronomy*, 14 (2), 101-107. **doi: 10.4081/ ija. 2019. 1413.**
17. Ekin, Z. (2019). Integrated use of humic acid and plant growth promoting rhizobacteria to ensure higher potato productivity in sustainable agriculture. *Journal of Sustainability*, 11 (12), 3417. **doi:10.3390/su11123417.**
18. Hayes, M. H. B., & Wilson, W. S. 1997. Humic Substances, Peats and Sludges: Health and environmental aspects. *The Royal society of Chemistry, Cambridge Publisher Inc*, Pp: 247-336.
19. Jing, J., Zhang, S., Yuan, L., Li, Y., Zhang, Y., & Zhao, B. (2022). Synergistic effects of humic acid and phosphate fertilizer facilitate root proliferation and phosphorus uptake in low-fertility soil. *International Journal of Plant-Soil Relationships*, 478 (1), 491-503. **doi: 10.1007/s11104-022-05486-2.**
20. Manivasagan, P., Sivasankar, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2013). Production and characterization of an extracellular polysaccharide from Streptomyces violaceus MM72. *International Journal of Biological Macromolecules*. 59, 29-38. **doi: 10. 1016/j.ijbiomac.2013.04.012.**
21. Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. *Journal of Current Microbiology*, 43, 51-56. **doi: 10.1007/ s002840010259.**
22. Rubio, M. G., Valencia-Plata, S. A., Bernal-Castillo, J., & Martínez-Nieto, P. (2000). Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. and Pseudomonas sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42 (4), 171-176.
23. Piper, C. S. (2019). Soil & plant analysis. Scientific Publishers. 367p.
24. Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., & Loeppert, R. H. (2020). Methods of soil analysis, Section III: Chemical methods. Pp: 869-920.
25. Farhat, M. B., Boukhris, I., & Chouayekh, H. (2015). Mineral phosphate solubilization by Streptomyces sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 362, 5. **doi: 10.1093/femsle/fnv008.**
26. Rashidi, N., Moezzi, A., & Rahnama, A. (2018). The effect of Humic acid on vegetative characteristics, absorption of Phosphorus and Potassium and Pistachio seedlings under drought stress. *Journal of Applied Soil Research*, 134-149. **doi:10.22034/JON.2020.1879490.1069.** [In Persian]
27. Feoktistova, A., Bakaeva, M., Timergalin, M., Chetverikova, D., Kendjieva, A., Rameev, T., & Chetverikov, S. (2022). Effects of Humic Substances on the Growth of Pseudomonas plecoglossicida 2, 4-D and Wheat Plants Inoculated with This Strain. *Journal of Microorganisms*, 10 (5), 10-66. **doi:10.3390/ microorganisms 10051066.**

28. Ojwang, L. M., & Cook, R. L. (2013). Environmental conditions that influence the ability of humic acids to induce permeability in model biomembranes. *Journal of Environmental Science & Technology*, 47 (15), 8280-8287. **doi: 10.1021/es4004922.**
29. Xie, Y., Gu, Z., Herath, H. M. S. K., Gu, M., He, C., Wang, F., & Zhang, Y. (2017). Evaluation of bacterial biodegradation and accumulation of phenanthrene in the presence of humic acid. *Journal of Chemosphere*, 184, 482-488. **doi:10.1016/ j.chemosphere. 2017.06.026.**
30. Yuan, Y., Gai, S., Tang, C., Jin, Y., Cheng, K., Antonietti, M., & Yang, F. (2022). Artificial humic acid improves maize growth and soil phosphorus utilization efficiency. *Journal of Applied Soil Ecology*, 179, 104-587. **doi: 10.2139/ssrn.4029383.**
31. Cozzolino, V., Monda, H., Savy, D., Di Meo, V., Vinci, G., & Smalla, K. (2021). Cooperation among phosphate-solubilizing bacteria, humic acids and Arbuscular mycorrhizal fungi induces soil microbiome shifts and enhances plant nutrient uptake. *Journal of Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8 (1), 1-18. **doi: 10.1186/ s40538-021-00230-x.**
32. Ahmad, S., Daur, I., Al-Solaimani, S. G., Mahmood, S., Bakhashwain, A. A., Madkour, M. H., & Yasir, M. (2016). Effect of Rhizobacteria inoculation and humic acid application on canola (*Brassica napus* L.) crop. *Pakistan Journal of Botany*, 48 (5), 2109-2120.
33. Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Journal of Applied Soil Ecology*, 34 (1), 33-41. **doi: 10.1016/j.apsoil.2005.12.002.**
34. Scharf, P. C., Brouder, S. M., & Hoeft, R. G. (2006). Chlorophyll meter readings can predict nitrogen need and yield response of corn in the north-central USA. *Journal of Agronomy*, 98 (3), 655-665. **doi: 10.2134/agronj 2005.0070.**
35. Vance, C. P., Uhde-Stone, C., & Allan, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *Journal of New phytologist*, 157 (3), 423-447. **doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x.**
36. Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., & Loeppert, R. H. 2020. Methods of soil analysis, part 3: Chemical methods. *John Wiley & Sons*, 1424p.
37. Ghorbani-Nasrabadi, R., Greiner, R., Alikhani, H. A., Hamedi, J., & Yakhchali, B. (2013). Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13 (1), 223-236. **doi: 10.4067/S0718-95162013005000020.**
38. Ghorbani-Nasrabadi, R. G., Greiner, R., Mayer-miebach, E., & Menezes-Blackburn, D. (2023). Phosphate solubilizing and phytate degrading Streptomyces isolates stimulate the growth and P accumulation of Maize (*Zea mays*) fertilized with different Phosphorus sources. *Journal of Geomicrobiology*, 40 (4), 325-336. **doi: 10.1080/01490451.2023.2168799.**