بررسی کاربرد و عدم کاربرد گوگرد در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته *سودوموناس فلورسنس* در ذرت (*Zea mays* L.)

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

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/٤ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲٦

۱- دانشجوی دکترای علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲و۳- دانشیار و استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

کودهای میکروبی فسفاته که از تلفیق بستر آلی (باگاس) و شیمیایی (سنگ فسفات و گوگرد) و افزودن باکتریهای حل‌کننده فسفات به دو شکل گرانوله یا پودری مورد استفاده قرار می‌گیرند، در پژوهش‌های سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند و هدف از آن تامین نیاز فسفاته گیاه می‌باشد. اما در مورد استفاده از گوگرد در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته سوالات و ابهاماتی وجود داشت که دلایل انجام این آزمایش بود. آیا گوگرد بر باکتریهای مورد استفاده اثر منفی ندارد و افزودن گوگرد می‌تواند مفید واقع شود؟ بر این اساس در این پژوهش استفاده و عدم استفاده از گوگرد در کود میکروبی فسفاته تولید شده پس از تامین جمعیت میکروبی اولیه مناسب (10^7) از باکتری *Pseudomonas fluorescens* مورد ارزیابی قرار گرفت. این کود بر بستر پایه (٤٥ گرم سنگ فسفات + ۳۰ گرم باگاس) با کاربرد گوگرد (۱۵ گرم) یا عدم کاربرد آن تهیه شد. تیمارهای آزمایش شامل شاهد (بدون بستر کود میکروبی)، بستر کود میکروبی بدون افزودن باکتری و کود میکروبی فسفاته در دو مقدار ۰/٦ و ۱/۲ گرم براساس آزمون خاک بود. نتایج به دست آمده از آزمایشات گلخانه‌ای تلقیح ذرت رقم سینگل‌کراس ۷۰٤ با کودهای میکروبی فسفاته فوق نشان داد که افزودن گوگرد در فرمولاسیون کود میکروبی نه تنها اثر بازدارنده بر باکتری نداشت بلکه تمام شاخص‌های رشدی و تغذیه‌ای گیاه ذرت را افزایش داد. کاربرد گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته باعث افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک ریشه (به ترتیب ٤۱/۸۵ و ٤۲/٤۷ درصد) و بخش هوایی (به ترتیب ۵۰/٤۹ و ۲۰/٦۲ درصد) شد. همچنین مقدار جذب فسفر، پتاسیم، آهن و روی بخش ریشه (به ترتیب ٤۵/۸٦، ۵۸/۰۱، ٤۵/۰۹ و ۷٦/۳۳ درصد) و بخش هوایی (به ترتیب ۲۸/٦٦، ۲۹/۷۹، ۵۰/۰۸ و ٦۷/۲۳ درصد) در حضور گوگرد افزایش یافت. به نظر افزودن گوگرد نه تنها اثر منفی بر باکتری *P. fluorescens* مورد استفاده در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته نداشته بلکه اثرات مثبت این کود را تشدید نموده است.

واژه‌های کلیدی: کود میکروبی فسفاته، باکتریهای حل‌کننده فسفات، گوگرد، *سودوموناس*، ذرت

Application and Non-Application of Sulfur in the Formulation of *Pseudomonas fluorescens* Phosphatic Microbial Fertilizer on Corn (*Zea mays* L.)

Bahman Khoshrou[1], Mohammad Reza Sarikhani[2*], Nasser Aliasgharzad[3]

Received: October 25, 2016 Accepted: February 14, 2017

1-PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
2-Assoc. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
3-Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

Phosphatic microbial fertilizers (PMFs) which produced from organic (Bagasse) and chemical (Rock phosphate and Sulfur) materials with combination of phosphate solubilizing bacteria (PSB) are taking more concerns in recent researches. These products are being used in two forms; granular or powder, to meet plant P demand. But application of sulfur in this formulation was the main reason of this research, whether the application of S in this context is useful or not? According to this main question, application and non-application of elemental sulfur in produced PMFs were evaluated in this study. This PMF was made after preparing the initial appropriate population (10^7 CFU/g) of the bacteria *Pseudomonas fluorescens* in the context of rock phosphate (45 g), bagasse (30 g) and sulfur (15 g). The treatments included the control (without adding any bacteria or PMF), microbial fertilizers bed without adding bacteria (or carriers) and PMFs in two levels of consumption (0.6 g and 1.2 g) based on soil analysis test. The results of greenhouse experiment showed that the addition of sulfur in the formulation of microbial fertilizers not only doesn't have any inhibiting effect on bacteria but also increases all the indices of growth and plant nutrient. Application of sulfur in phosphatic microbial fertilizers had significant increase on total wet and dry weight of shoot (50.48 and 20.62 %, respectively) and root (41.85 and 42.47 %, respectively), the content of phosphorus, potassium, iron and zinc in the root (45.86, 58.01, 45.09 and 76.33%, respectively) and shoot (28.66, 29.79, 50.08 and 67.23%, respectively) of corn variety S.C.704. Inoculation with microbial fertilizers and plant growth promoting bacteria *P. fluorescens* with chemical element sulfur led to rhizosphere colonization and caused an increasing effect on plant growth and its nutrition. It seems that addition of sulfur not only has not a negative effect on *P. fluorescens* bacteria but also the positive effects of this fertilizer have improved.

Keywords: Bacterial Fertilizers Phosphate, Phosphate Solubilizing Bacteria, Sulfur, *Pseudomonas*, Corn

مقدمه

فسفر بعد از نیتروژن به عنوان عنصر غذائی حیاتی برای گیاهان و ریزجانداران محسوب می‌شود. علی‌رغم بالا بودن فسفر کل خاکها، دسترسی آن برای گیاه کم است. قسمت عمده فسفر خاک به همراه کاتیون‌های فلزی رسوب کرده و از دسترس گیاه خارج می‌شود و به همین دلیل نیز استفاده از این کودها دارای اثربخشی کمی است (پائول ۲۰۰۷، خان و همکاران ۲۰۰۷). روش متداول برای مقابله با این کمبودها استفاده از کودهای شیمیایی است که علاوه بر قیمت زیاد و بازدهی کم، احتمال آلودگی‌های زیست محیطی را به دنبال دارند (مودایهش و همکاران ۱۹۸۹). تولید محصول در خاکهای آهکی، همواره با مشکلات متعددی همراه است که بخش اصلی این مشکلات به غلظت زیاد یون کلسیم و بالا بودن pH خاک مربوط می‌گردد. به دلیل وابستگی قابلیت جذب فسفر و برخی عناصرغذایی کم‌مصرف به pH، معمولاً درچنین خاکهایی این عناصر تثبیت‌شده و از دسترس گیاه خارج می‌شوند (بشارتی کلایه ۱۹۹۹). یکی از روش‌های جایگزین و پایدار برای مقابله با کمبود فسفر خاک، استفاده از کودهای زیستی و بهره‌گیری از باکتریهای حل‌کننده فسفات می‌باشد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱٤). کود زیستی یا بیولوژیک اصطلاحاً به مواد حاوی ریزجاندارانی اطلاق می‌شود که هنگامی‌که بر روی بذر، سطح ریشه و یا در خاک استفاده شود موجب تحریک و افزایش رشد گیاه می‌شود (وسی ۲۰۰۳). کودهای زیستی یکی از مهم‌ترین اجزاء کشاورزی آلی و پایدار محسوب می‌شوند که استفاده درست از آنها می‌تواند ضمن افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات کشاورزی و کاهش مصرف برخی از انواع کودهای شیمیایی، حفظ محیط زیست را نیز به‌دنبال داشته باشد (لیچ و مامفورد ۲۰۰۸). کود میکروبی نوعی کود زیستی است که با یک سری مواد اعم از مواد معدنی، آلی، کودهای شیمیایی و مواد پرکننده فرموله شده و معمولاً مقدار و نحوه مصرف آنها مشابه کودهای شیمیایی می‌باشد. کودهای میکروبی گرانوله از نمونه‌های بارز آن می‌باشد. کود میکروبی فسفاته به صورت جامد و به اشکال گرانوله یا پودری تهیه می‌شود و دارای ریزجانداران حل‌کننده فسفات است که به منظور تامین بخش قابل ملاحظه‌ای از فسفر مورد نیاز گیاهان استفاده می‌شود (ضیائیان و همکاران ۲۰۱۰). هدف اصلی از توسعه فناوری زیستی در خصوص باکتری‌های محرک رشد گیاه، افزایش جمعیت باکتری‌های مؤثر در خاک است که می‌تواند به توسعه کشاورزی پایدار کمک کند و نیاز به استفاده از کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها را کاهش دهد (آدسمویه و کلوپر ۲۰۰۹). با توجه به آهکی بودن خاکهای کشور و بالا بودن pH در آنها، استفاده از گوگرد به منظور تعدیل اسیدیته خاک توصیه می‌شود. گوگرد به عنوان عنصر غذایی ضروری و پرمصرف گیاه شناخته شده و از این لحاظ در ردیف پنجم پس از نیتروژن، فسفر، پتاسیم و کلسیم قرار می‌گیرد (سالاردینی ۱۹۹۵). کمبود این عنصر در گیاه عملکرد را در نتیجه تغذیه نامناسب کاهش می‌دهد و از ارزش کیفی محصولات مانند درصد پروتئین و روغن نیز می‌کاهد (قربانی ۲۰۰۲). مودایهش و همکاران (۱۹۸۹) به منظور بررسی اثر گوگرد بر قابلیت دسترسی عناصر غذایی در خاک‌های آهکی، به سه خاک آهکی که از نظر مقدار فسفر و عناصرکم مصرف با یکدیگر متفاوت بودند، مقادیر مختلف گوگرد اضافه کردند، نتایج آنها نشان داد که در هر سه نوع خاک مقدار آهن، مس و منگنز قابل دسترس افزایش یافت. کاچهاو و همکاران (۱۹۹۷) در یک آزمایش مزرعه‌ای طی مصرف منابع مختلف گوگرد نشان دادند که جذب فسفر در نخود با افزایش مقدار گوگرد افزایش می‌یابد. در یک آزمایش مزرعه‌ای مقدار ۱۵ گرم ماده آلی به صورت کمپوست کود اسبی، کود گاوی تازه و کود سبز برموداگراس و میزان ۵ گرم گوگرد به هر کیلوگرم خاک اضافه شد. پس از اعمال تیمارها و گذشت ۲۷۰ روز، نتایج آزمایش نشان داد که مصرف توأم گوگرد و مواد آلی در خاک، pHخاک را ۰/۱٦ واحد کاهش داده و میزان

شوری خاک dS/m ۰/٤۸ و سولفات محلول ۱٤٥٥ میکروگرم بر گرم افزایش یافت. بر اساس همین نتایج در آزمایش گلخانه‌ای ۲۰ درصد و در آزمایش مزرعه‌ای ۲۲ درصد گوگرد مصرف شده به سولفات تبدیل شد و درصد آهک خنثی شده در آزمایش گلخانه‌ای فقط ۲/۳ درصد و در آزمایش مزرعه‌ای ٥/۱ درصد بوده است. در این آزمایش میزان منگنز و آهن افزایش یافت ولی میزان فسفر و روی قابل دسترس تغییری نکرد. در آزمایش مزرعه‌ای فقط میزان منگنز به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد (سیفوئنتز و لیندمان ۱۹۹۳).

بشارتی (۱۹۹۹) در یک بررسی گلخانه‌ای که در خاک آهکی روی ذرت انجام داد، گزارش کرد که با مصرف ۰/٥ درصد (وزنی) گوگرد عنصری در مقایسه با شاهد، pHخاک ۱/۳ واحد کاهش یافت. مقدار فسفر قابل جذب خاک بر اثر کاهش pH، از٤/۹۹ به ۱۲/۸۷ و آهن قابل جذب خاک نیز از ۲/۰۷ به ۳/۸۲ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش یافت. وانگ و همکاران (۲۰۰۸) مطالعاتی درباره تأثیر گوگرد عنصری بر قابلیت دسترسی مس و روی و ترکیب اجتماع میکروبی خاک در شرایط آزمایشگاهی انجام دادند. نتایج نشان داد که با کاربرد ۲۰ گرم گوگرد در هرکیلوگرم خاک، pHخاک حدود سه واحد کاهش یافت. و انحلال‌پذیری مس و روی در خاکهای آهکی بعد از ٦٤ روز انکوباسیون به طور معنی‌داری افزایش یافت. غلظت مس در ریشه و ساقه گیاه جاذب مس افزایش پیدا کرد و غلظت مس در ساقه‌های گیاه ۱٥٦/٥ میلی‌گرم در کیلوگرم در تیمارهای گوگردی بود که ۲/٥ برابر بیش از تیمارهای فاقد گوگرد بود. همچنین حضور باکتری‌های اسیدوفیل در خاک بر اثر کاربرد گوگرد ثابت شد. کاپلان و ارمان (۱۹۹۸) در یک خاک آهکی (pHخاک ۷/۸ و درصد کربنات کلسیم ۳۷/۳) پس از افزودن مقادیر ۰، ٥۰۰، ۱۰۰۰ و ۱٥۰۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار، در گلدان‌های ٥ کیلوگرمی سورگوم کشت کردند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که مصرف گوگرد تأثیر معنی‌داری بر کاهش pH و افزایش قابلیت جذب فسفر دارد. گوگرد عنصری، پس از اکسایش در خاک می‌تواند علاوه بر نقش تغذیه‌ای مستقیم، بدلیل تولید اسیدسولفوریک، باعث کاهشpH خاک گردد و لذا به طور غیرمستقیم نیز بر افزایش جذب فسفر و دیگر عناصر غذایی کم مصرف مؤثر واقع شود. امروزه گوگرد متداولترین و اقتصادی‌ترین ماده‌ای است که برای اسیدی کردن خاک به کار می‌رود (رشیدی و کریمیان ۲۰۰۰). با توجه به بالا بودن میزان آهک خاک های ایران و فراوانی گوگرد در کشور، مصرف این ماده در خاک نه تنها باعث اصلاح خواص خاک و افزایش عملکرد محصولات کشاورزی می‌گردد، بلکه موجبات افزایش راندمان کودهای کم مصرف و فسفره را نیز فراهم می‌آورد (بشارتی و صالح راستین ۲۰۰۰).

بر خلاف نیتروژن، منابع تولیدکننده فسفر تجدیدپذیر نیست و این منابع تا ۱۰۰ سال دیگر به اتمام می‌رسد، از طرف دیگر آلودگی‌های روزافزون ناشی از کاربرد کودهای شیمیایی فسفاته به ویژه آلودگی آنها به عنصر سنگین کادمیم، ضرورت یافتن جایگزین مناسب برای رهاسازی فسفاتهای تجمع یافته در خاک را ایجاب می‌کند، بنابراین ضروری است که به دنبال راه‌حل‌های مناسب برای رفع این مشکلات بود. باتوجه به موارد و مشکلات فسفر مصرفی اعم از آلودگی ناشی از کودهای فسفره و تثبیت شدن کودهای فسفره شیمیایی و نیز انحلال پایین منابع فسفر در خاکها، لذا هدف از این پژوهش این بود که در کنار استفاده از پتانسیل ریزجانداران خاکزی برای تامین فسفر گیاه (انحلال فسفات کم محلول)، کاربرد و عدم کاربرد عنصر گوگرد در فرمولاسیون کودهای میکروبی فسفاته مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه، آنالیز و آماده‌سازی خاک

این پژوهش در سال‌های ۱۳۹٤ و ۱۳۹٥ در گلخانه واقع در ساختمان شماره ۲ دانشکده کشاورزی دانشگاه

تبریز واقع در منطقه کرکج انجام شد. برای این منظور از یک خاک دارای کمبود فسفر (از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان) از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری شد و سپس برخی ویژگی‌های خاک مورد نظر تعیین گردید. ویژگیهای خاک مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. بعد از هوا خشک کردن خاک مورد نظر و عبور از الک دو میلی‌متری ویژگی‌های مهم خاک شامل بافت (کلوت ۱۹۸٦)، درصد کربن آلی (نلسون و سامرز ۱۹۸۲)، فسفر قابل جذب (اولسن وسامرز ۱۹۸۲) و پتاسیم قابل جذب (توماس ۱۹۸۲) اندازه‌گیری شد. خاک گلدان‌ها در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ٤۰ دقیقه با بخار آب استریل شده و سپس در هر گلدان به مقدار ۳ کیلوگرم استفاده شد.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

بافت خاک	pH	EC (dS/m)	P- available (mg/kg)	K- available (mg/kg)	$\%CaCO_3$	%OC
لومی شنی	۷/٥٦	۲/۹	۳	۱۹۸/۰۷	۲/۸٥	۰/۱٦٦

تهیه کود میکروبی فسفاته پودری

در این پژوهش باکتری *Pseudomonas fluorescens* Tabriz تهیه شده از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفت. به منظور تهیه کود میکروبی فسفاته پودری برای آزمایش کشت گلدانی، به شرح زیر اقدام شد. برای تهیه بستر اولیه جهت افزودن مایه تلقیح باکتریایی از بستر پایه سنگ فسفات (با آنالیز: P_2O_5 : ۱٪ ±۳٦/٥، Fe_2O_3 : ۱٪±۳/۷، CaO : ٤٪±٥۰، SiO_2:۱٪±۳/٥ ، MgO ۱±۰/٥٪ ، SO_3 : ۰/۰٥٪ ، F :۱٪±۳ ، CL : ۰/۰۳٪±۰/۱۸ ، Cd: ٥±۱۰ ppm)، باگاس و گوگرد استفاده شد. این اجزاء به نسبت ٤٥: ۳۰ : ۱٥ مخلوط شدند (ضیائیان و همکاران ۲۰۱۰). پس از اختلاط اجزاء و تامین رطوبت اولیه (۱۰٪) برای افزودن باکتری به آن، به صورت زیر عمل شد. سپس از کشت شبانه باکتری تهیه شده در محیط نوترینت براث ۱ میلی‌لیتر برداشته و ۱۰ برابر در آب استریل رقیق نموده و باکتری به بستر مرطوب افزوده شد و مخلوط شد. بدین ترتیب جمعیت اولیه 10^7 CFU/g در بستر کود میکروبی فراهم شد. از کود میکروبی فسفاته پودری حاصل شده برای آزمایشات بعدی استفاده شد.

آماده‌سازی گلدان‌ها و تلقیح گیاهان با کودهای میکروبی

با احتساب وزن ۲ میلیون کیلوگرم خاک در هر هکتار با توجه به وزن خاک گلدان و طبق توصیه کودی (ملکوتی ۱۹۹٥)، ۱۲۰۰ میلی‌گرم کود اوره و ٦۰۰ میلی‌گرم سولفات پتاسیم برای هر گلدان استفاده شد. اوره و سولفات پتاسیم به همه گلدانها افزوده شد اما کود فسفاته استفاده نشد و به جای آن از کود میکروبی فسفاته تهیه شده (در دو سطح ٦۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم) استفاده شد. همچنین در دو تیمار اضافی به عنوان کنترل منفی آزمایش، مقادیر ٦۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بستر مورد استفاده در کود میکروبی بدون افزودن هیچ باکتری مد نظر قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل تیمارهای ۱- بدون بستر پایه ۲- بستر پایه بدون باکتری (کنترل منفی) ۳- بستر پایه حاوی باکتری *P. fluorescens* ٤- بستر پایه بدون گوگرد حاوی باکتری *P. fluorescens* در ٤ تکرار به اجرا درآمد. بایستی عنوان نمود که بستر پایه شامل ٤٥ گرم سنگ فسفات، ۳۰ گرم باگاس و ۱٥ گرم گوگرد بود. به منظور اعمال تیمارها ابتدا در تمام گلدانها مقادیر برابر از خاک تا ٤ سانتی‌متر از سطح گلدان افزوده شد

و سپس کود میکروبی فسفاته به مقدار مورد نیاز در گلدانها استفاده شده، سپس یک لایه خاک (cm ۳- ۲) بر روی آن قرار گرفته و بذور ذرت (رقم سینگل‌کراس ۷۰٤) بر روی آن قرار گرفت. بعد از آن با لایه‌ای از خاک سطح بذور پوشانده شد. برای آماده‌سازی بذرها، ابتدا ضدعفونی بذرها با اتانول و هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ انجام گرفت و بذرهای ذرت به تعداد ۵ عدد در هر گلدان کاشته شدند و بعد از جوانه‌زنی و رشد اولیه تعداد بوته در هر گلدان به دو عدد کاهش یافت. قبل از کاشت در همه گلدانها به مقدار برابر رطوبت خاک تامین شده و سپس کشت بذور انجام گرفت. با توجه به استفاده از اوره و سولفات پتاسیم، کل مقدار این کودها برای همه گلدانها محاسبه شده و پس از انحلال در آب به مقدار یکسان به همه گلدانها داده شد. برای تامین نیتروژن و پتاسیم مورد نیاز گیاه به ترتیب به ازاء هر گلدان ۱۲۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم از اوره و سولفات پتاسیم استفاده شد. آبیاری گلدانها نیز از طریق توزین در ۰/۸ ظرفیت زراعی در طول رشد گیاه که ۱۰۵ روز به طول انجامید، انجام پذیرفت. پارامترهای رشدی گیاه از جمله ارتفاع، قطر ساقه، شاخص کلروفیل، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه و میزان جذب فسفر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

اندازه گیری شاخص‌های رشدی گیاه

شاخص‌های رشدی گیاه از قبیل ارتفاع، قطر ساقه، شاخص کلروفیل، وزن تر و خشک بخش هوایی اندازه‌گیری شد. غلظت کلروفیل برگ شاخص مستقیم سلامتی گیاه و وضعیت رشد آن است. مقدار کلروفیل برگ پس از رشد کامل برگ‌ها و در پایان دوره رشد با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج اندازه‌گیری شد. در پایان دوره رشد، اندام‌های هوایی از محل طوقه قطع گردیده و وزن تر آنها با ترازوی حساس ۰/۰۰۱ گرم تعیین شد. ریشه نیز پس از برداشت با آب معمولی شستشو داده شده و رطوبت اضافی آنها با کاغذ خشک‌کن گرفته شد و سپس با ترازو وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین بخش هوایی و ریشه داخل پاکت‌های کاغذی به درون آون منتقل شده و به مدت سه روز در دمای ٦۰ درجه‌سانتی‌گراد خشک شدند. سپس نمونه‌ها از آون خارج گردیده و با ترازوی حساس وزن خشک آن‌ها توزین گردید.

هضم نمونه‌های گیاه و اندازه‌گیری غلظت عناصر در بافت گیاهی

نمونه‌ها بعد از خشک شدن، خرد شده و برای ایجاد نمونه‌ای یکنواخت از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شدند. برای اندازه‌گیری عناصر P، K و Fe هضم نمونه‌های گیاهی به روش ترسوزانی انجام گرفت (والینگ و همکاران ۱۹۸۹). برای اندازه‌گیری غلظت فسفر و پتاسیم نمونه‌های گیاهی به ترتیب از دستگاه اسپکتروفتومتر و فلیم‌فتومتر و برای عناصر آهن و روی هم از دستگاه جذب اتمی استفاده شد.

طرح و آنالیز آماری

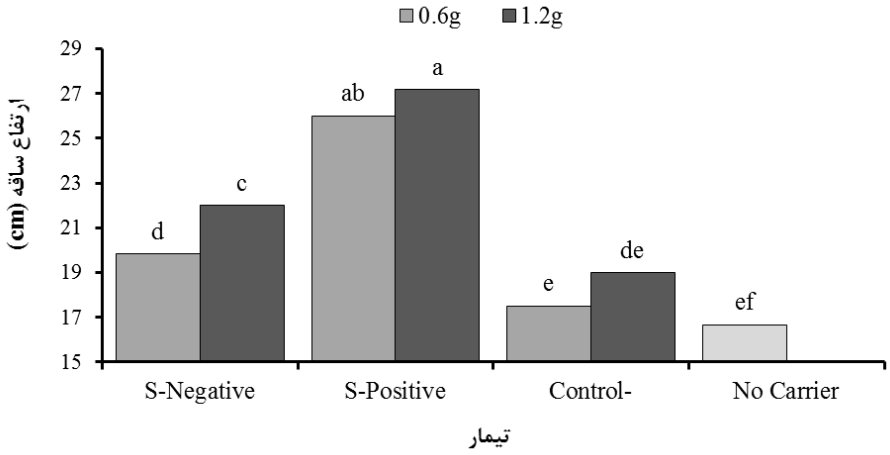
طرح آماری استفاده شده در این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن ۷ تیمار آزمایشی (شامل فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته با و بدون گوگرد در حالات تلقیح شده با باکتری *P. fluorescens* و بدون تلقیح با باکتری در دو سطح استفاده ۰/٦ گرم در گلدان و ۱/۲ گرم در گلدان، و یک نمونه شاهد بدون تلقیح) در سه تکرار بود. تجزیه واریانس داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS و مقایسات میانگین‌ها به روش دانکن انجام شد.

نتایج

وجود و عدم وجود گوگرد در کود میکروبی فسفاته بررسی و نتایج آن در زیر آورده شد.

ارتفاع ساقه

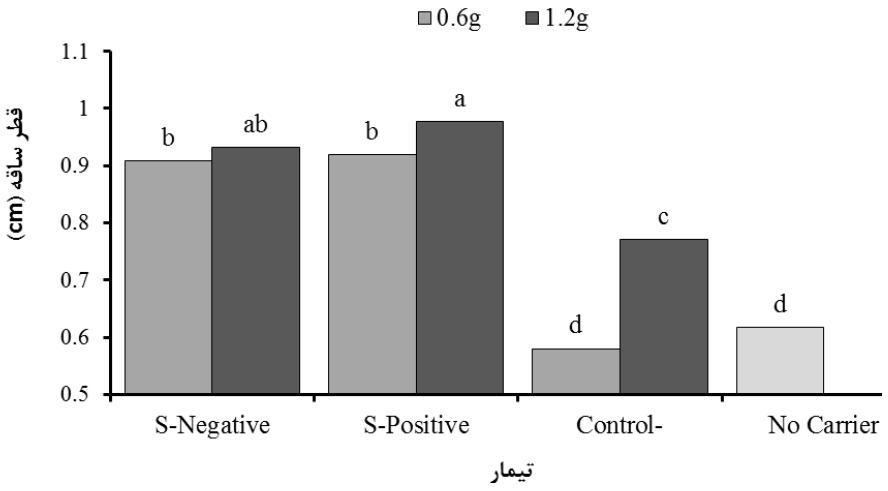
ارتفاع ساقه ذرت تحت تاثیر وجود گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۱). نتیجه بدست آمده در این قسمت نشان داد که در تیمار بدون گوگرد کود میکروبی فسفاته (در هر دو سطح مصرفی) ارتفاع ساقه بیشتر از تیمارهای شاهد (کنترل منفی و بدون بستر کود میکروبی فسفاته) می‌باشد لذا تاثیر باکتری *P. fluorescens* بر افزایش ارتفاع ساقه مشخص می‌شود. در ادامه با افزوده شدن عنصر گوگرد شاهد افزایش معنی‌دار در پارامتر ارتفاع ساقه شدیم که میتوان به اثر تلفیقی باکتری و گوگرد ارتباط داد. در مقام مقایسه، عدم استفاده از بستر پایه کود میکروبی (No carrier) و استفاده از بستر پایه کود میکروبی بدون تلقیح باکتری در آن (Control-) به مقدار ۶۰۰ میلی‌گرم در هر گلدان با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند اما با افزودن باکتری به آن، چه در فقدان گوگرد بر بستر پایه و چه در حضور گوگرد ارتفاع ساقه به ترتیب ۱۱/۷۴ و ۳۲/۶۹ درصد افزایش نشان داد. این مطلب در استفاده از همین تیمارها برای مقدار استفاده ۱۲۰۰ میلی‌گرم در هر گلدان نیز مشاهده شد و افزایش‌های ۲۰/۴۵ و ۳۵/۵۶ درصدی را نسبت به تیمار شاهد (Control-) باعث شد.



شکل ۱- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر ارتفاع بوته ذرت

قطر ساقه

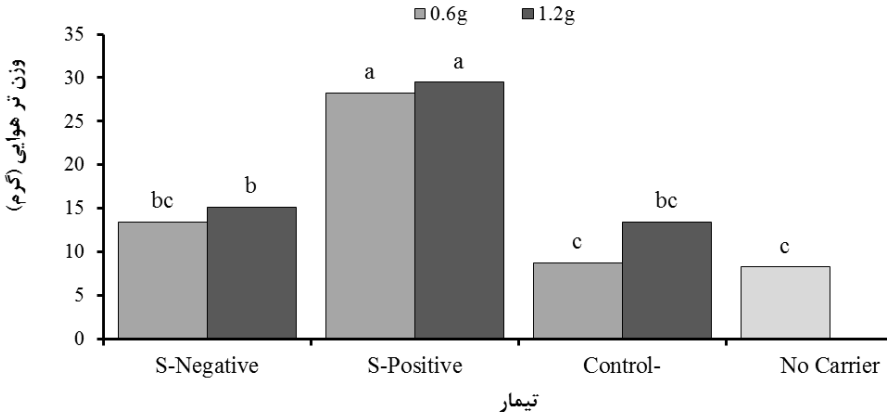
قطر ساقه ذرت گرچه تحت تاثیر تیمارهای کود میکروبی فسفاته دارای باکتری حل‌کننده فسفات بود و اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با تیمارهای شاهد بدون بستر و بستر بدون باکتری داشتند اما وجود گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته اثر معنی‌داری بر این شاخصه رشدی گیاه ذرت نشان نداد (شکل ۲). نتیجه بدست آمده در این قسمت نشان میدهد که در تیمار بدون گوگرد و دارای گوگرد کود میکروبی فسفاته (در هر دو سطح مصرفی) مقدار قطر ساقه بیشتر از تیمارهای شاهد (کنترل منفی و بدون بستر کود میکروبی فسفاته) می‌باشد و این در حالی است که در بین تیمارهای دارای گوگرد و بدون گوگرد اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.



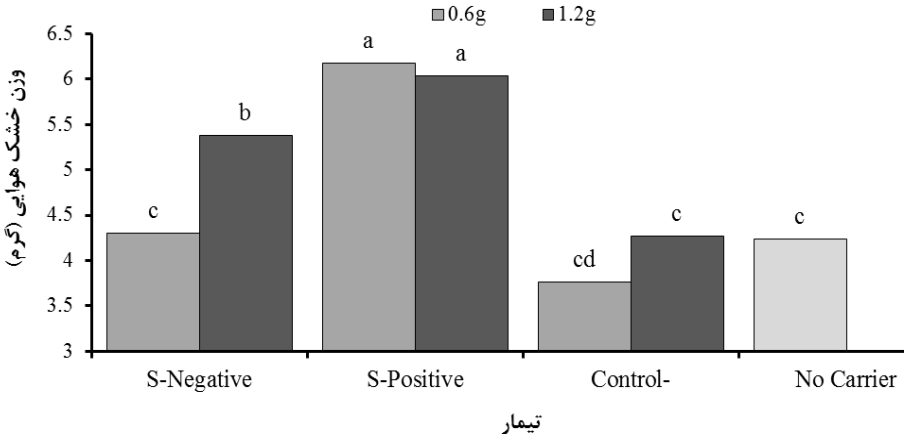
شکل ۲- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر قطر ساقه ذرت

وزن تر و خشک بخش هوایی

وزن تر و خشک بخش هوایی در گیاه ذرت تحت تاثیر وجود گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. مطابق شکل ۳ مشاهده می‌گردد که تاثیر باکتری *P. fluorescens* بر وزن تر گیاه ذرت اثر افزایشی داشته و این تاثیر با مصرف گوگرد دارای اثر افزایشی دو برابری بوده است. مطابق شکل ٤ مشاهده می‌گردد که در اینجا نیز شرایط حاکم بر وزن تر بخش هوایی دیده می‌شود و تاثیر باکتری *P. fluorescens* بر وزن خشک گیاه ذرت نیز دارای اثر افزایشی بوده و این تاثیر با مصرف گوگرد باعث افزایش حدود دوبرابری شده است. نکته قابل توجه آنکه تیمارهای بدون بستر و کنترل منفی و کود میکروبی در مقدار ۰/٦ گرم چه در وزن تر بخش هوایی (شکل ۳) و چه در وزن خشک هوایی (شکل ٤) همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند و اختلافی بین آنها مشاهده نشد اما وجود گوگرد در مقایسه با عدم وجود گوگرد در کود میکروبی فسفاته در دو مقدار مصرفی ۰/٦ و ۱/۲ گرم در هر گلدان، به ترتیب باعث افزایش وزن تر به مقدار ۵۲/۳۷ و ٤۸/٦۲ درصد شدند. همچنین این افزایش در وزن خشک هوایی به ترتیب ۳۰/۳۰ و ۱۰/۹٤ درصد بود.



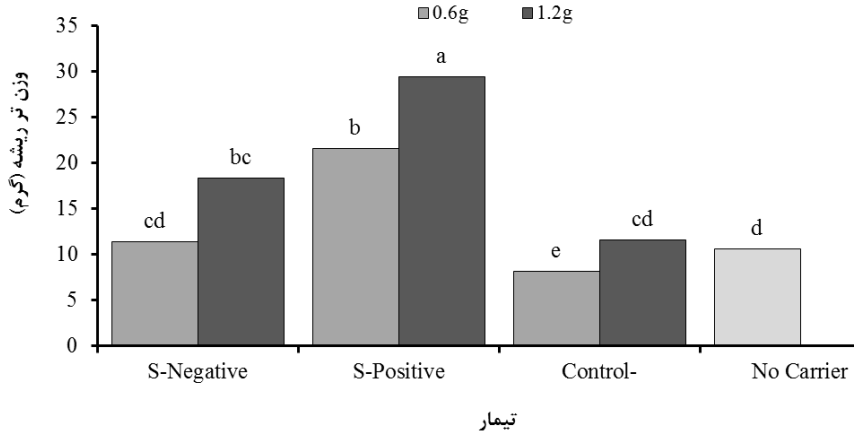
شکل ۳- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر وزن تر بخش هوایی ذرت



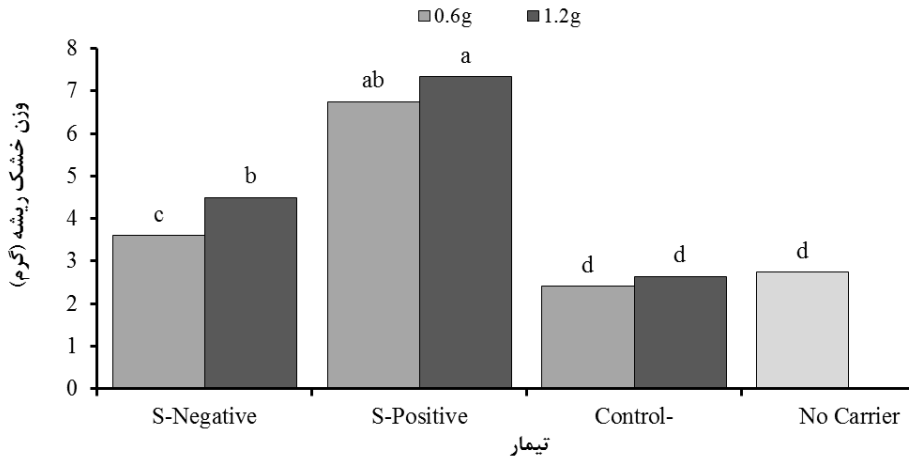
شکل ۴ - تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر وزن خشک بخش هوایی ذرت

وزن تر و خشک ریشه

وزن تر و خشک بخش ریشه در گیاه ذرت تحت تاثیر وجود گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. مطابق شکل ۵ و ٦ مشاهده می‌گردد که در اینجا نیز تا حدودی شرایط حاکم بر بخش هوایی گیاه ذرت دیده می‌شود و تاثیر باکتری *P. fluorescens* بر وزن تر و خشک ریشه گیاه ذرت نیز دارای اثر افزایشی بوده و این تاثیر با مصرف گوگرد دارای اثر افزایشی بیش از دوبرابر بوده است.



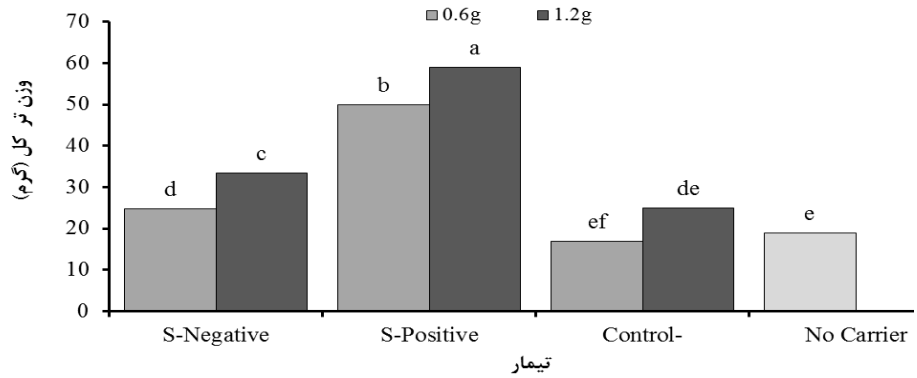
شکل ۵- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر وزن تر ریشه ذرت



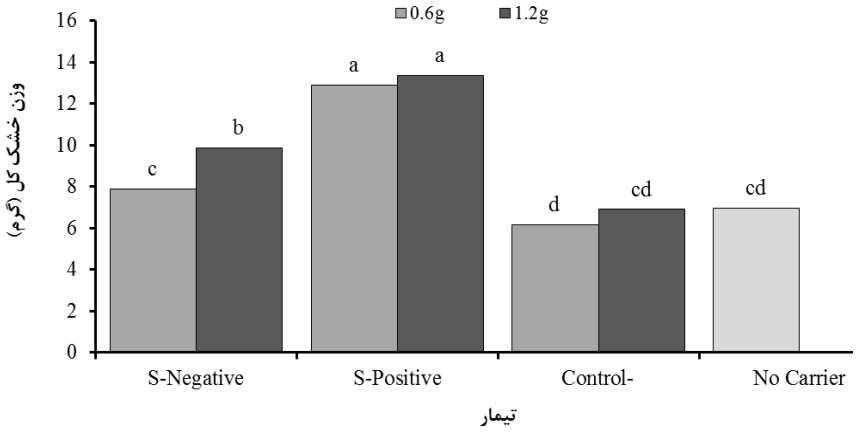
شکل ۶- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر وزن خشک ریشه ذرت

وزن تر و خشک کل

وزن تر و خشک کل در گیاه ذرت تحت تاثیر وجود گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. مطابق شکل‌های ۷ و ۸ مشاهده می‌گردد که تاثیر باکتری *P. fluorescens* بر وزن تر و خشک کل گیاه ذرت نیز دارای اثر افزایشی بوده و مصرف گوگرد باعث افزایش دو برابری شده است. وزن تر کل در تیمار میکروبی به همراه گوگرد در مقایسه با تیمار کنترل منفی (یعنی بستر پایه بدون افزودن باکتری *P. fluorescens*) در دو سطح مصرفی ۰/۶ و ۱/۲ گرم، ۶۶/۲۸ و ۵۷/۵۲ درصد افزایش به همراه داشت، اما در کود میکروبی تهیه شده از *P. fluorescens* زمانی‌که گوگرد از بستر پایه حذف شد در مقایسه با تیمار دارای گوگرد به ترتیب ۵۰/۲۵ و ۴۳/۱۹ درصد کاهش در وزن تر کل در دو سطح مصرفی مشاهده شد (شکل ۷). در وزن خشک کل نیز شرایط مشاهی حاکم بود. تیمار میکروبی به همراه گوگرد در مقایسه با تیمار کنترل منفی (یعنی بستر پایه بدون افزودن باکتری *P. fluorescens*) در دو سطح مصرفی ۰/۶ و ۱/۲ گرم، به ترتیب ۵۲/۲۸ و ۴۸/۳۵ درصد افزایش را به دنبال داشت و در زمان حذف گوگرد از بستر میکروبی شاهد کاهش ۳۸/۸ و ۲۶/۱۲درصدی وزن خشک کل به ترتیب در دو سطح مصرفی ۰/۶ و ۱/۲ گرم بودیم (شکل ۸).



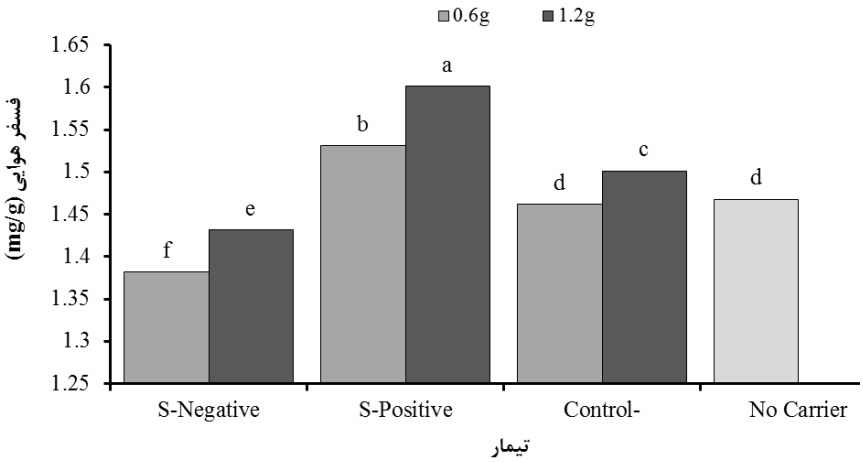
شکل ۷- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر وزن تر کل ذرت



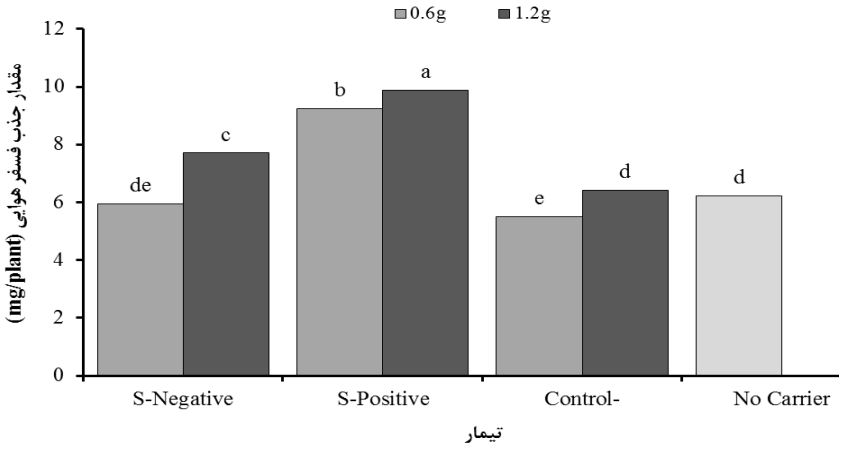
شکل ۸- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر وزن خشک کل ذرت

غلظت و مقدار جذب فسفر بخش هوایی

غلظت فسفر و مقدار جذب فسفر در گیاه ذرت تحت تاثیر وجود گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. مطابق شکل ۹ و ۱۰ در صورت عدم مصرف گوگرد غلظت و مقدار فسفر بخش هوایی کاهش معناداری نشان می‌دهد به طوری که منجر به کاهش این پارامتر در حد پایین‌تر از تیمارهای شاهد (کنترل منفی و بدون بستر کود میکروبی فسفاته) می‌گردد. برای پرداختن به اثر تیمارهای مورد استفاده بر وضعیت فسفر در بخش هوایی گیاه شاید توجه به مقدار جذب این عنصر مناسبتر از غلظت آن باشد زیرا که اثر رقت می‌تواند باعث ایجاد حالت‌هایی شود که جواب به دست آمده را دور از انتظار نشان دهد. غلظت و مقدار فسفر بخش هوایی در هر دو شکل ۹ و ۱۰ از الگوی یکسانی تبعیت کردند. اما مقدار جذب فسفر در بافت خشک بخش هوایی ذرت در تیمارهای کود میکروبی در بستر پایه مرسوم (یعنی وجود گوگرد) در مقایسه با تیمار کنترل منفی (یعنی بستر پایه بدون افزودن باکتری *P. fluorescens*) در دو سطح مصرفی ۰/۶ و ۱/۲ گرم، ۴۰/۴۷ و ۳۵/۲۲ درصد افزایش نشان داد، اما در کود میکروبی تهیه شده از *P. fluorescens* زمانیکه گوگرد از بستر پایه حذف شد در مقایسه با تیمار دارای گوگرد به ترتیب ۳۵/۷۱ و ۲۲/۰۶ کاهش در جذب فسفر در دو سطح مصرفی مشاهده شد (شکل ۱۰).



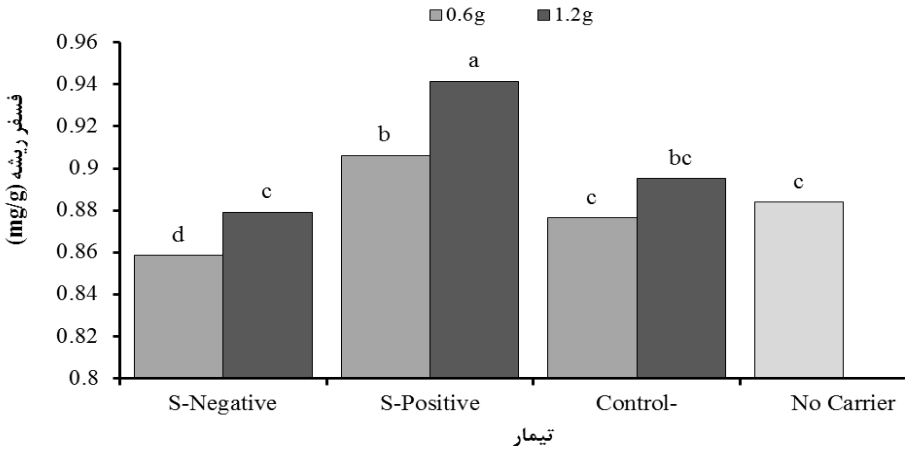
شکل ۹- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر غلظت فسفر بخش هوایی ذرت



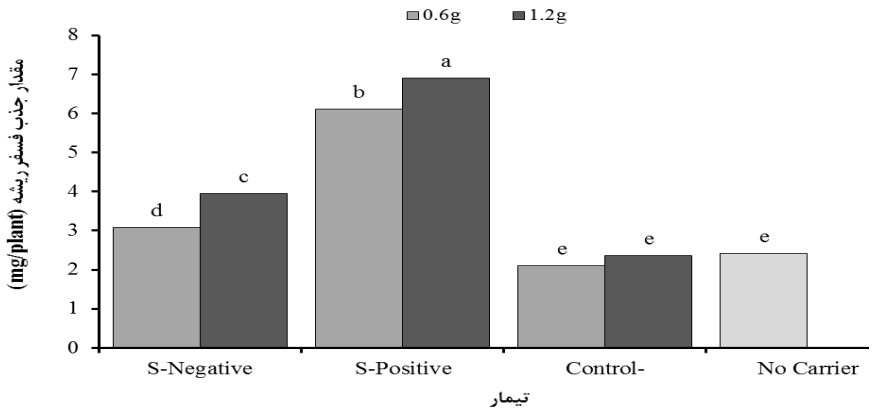
شکل ۱۰- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر مقدار فسفر بخش هوایی ذرت

غلظت و مقدار جذب فسفر بخش ریشه

اعمال تیمارهای مورد نظر بر غلظت و مقدار فسفر ریشه اثر معنی‌داری داشت (در سطح احتمال ۵٪). مطابق شکل ۱۱ و ۱۲ در صورت عدم مصرف گوگرد غلظت و مقدار فسفر بخش ریشه کاهش معناداری نشان می‌دهد به طوری که منجر به کاهش این پارامتر در حد پایین‌تر از تیمارهای شاهد (کنترل منفی و بدون بستر کود میکروبی فسفاته) می‌گردد. آزمایش نشان داد که تیمار باکتریایی بدون گوگرد *P. fluorescens* از نظر آماری دارای غلظت فسفر پایین‌تری نسبت به تیمار باکتریایی *P. fluorescens* به همراه گوگرد و تیمارهای شاهد بود و این نشان می‌دهد که برای کارایی این باکتری در زمینه انحلال فسفر و نفع‌رسانی برای گیاه، عنصر گوگرد نقش مهمی ایفا می‌کند، به طوری که مصرف گوگرد باعث افزایش معنی‌دار فسفر گیاه ذرت شده است. بر اساس نتایج این آزمایش مقدار جذب فسفر ریشه با افزودن باکتری بر بستر پایه کود میکروبی ٦٥/٥٧ و ٦٥/٨٩ درصد افزایش را سبب شد، این در حالی است که حذف گوگرد از این فرمولاسیون منجر به کاهش ٤٩/٣٤ و ٤٢/٦٧ درصدی در دو سطح مصرفی ٦٠٠ و ١٢٠٠ میلی‌گرم در هر گلدان شد (شکل ١٢).



شکل ۱۱- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر غلظت فسفر ریشه ذرت

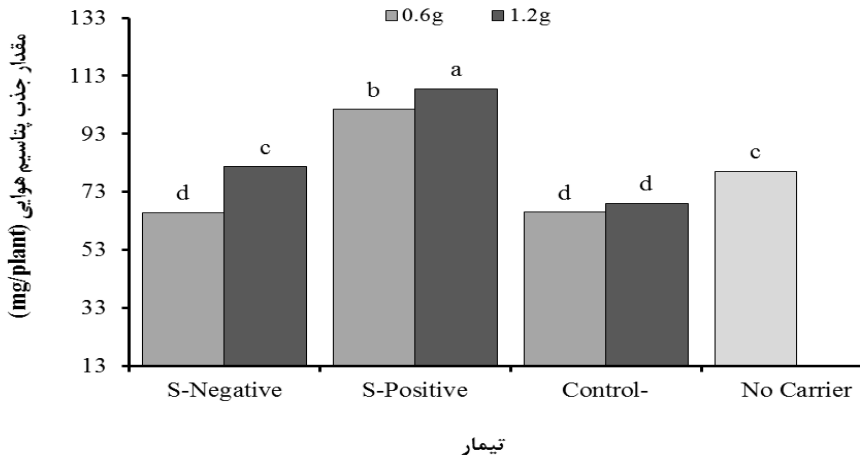


شکل ۱۲- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر مقدار جذب فسفر ریشه ذرت

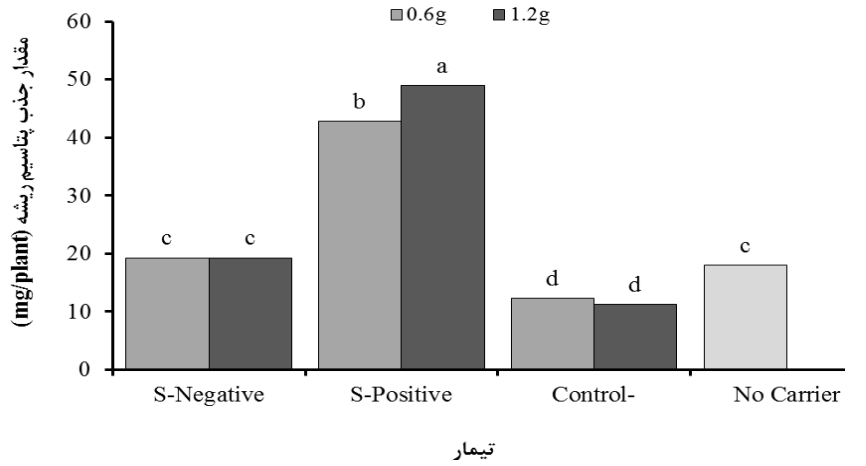
بشارتی (۲۰۰۱) در مطالعه‌ای اظهار نمود که اکسایش گوگرد در خاک تأثیر مثبت و معنی‌داری بر حلالیت فسفات و فسفر قابل جذب گیاه دارد که در نتیجه با افزایش حلالیت این عناصر افزایش فراهمی آنها را برای گیاه بدنبال دارد. کوچک زاده (۲۰۰۳) بیان کرد که فسفر آزاد شده از خاک فسفات با اسید سولفوریک تولید شده طی فرآیند اکسایش گوگرد رابطه مستقیم دارد.

مقدار جذب پتاسیم بخش هوایی و ریشه

مقدار جذب پتاسیم در بخش هوایی و ریشه گیاه ذرت تحت تاثیر وجود گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. مطابق شکل ۱۳ و ۱٤ ملاحظه می‌شود که هم باکتری (*P. fluorescens*) و هم عنصر گوگرد به کاررفته در کود میکروبی فسفاته توانسته‌اند منجر به افزایش قابل ملاحظه‌ای در جذب پتاسیم در گیاه شوند. در شکل‌های زیر مشخص می‌باشد که غلظت پتاسیم در بافتهای گیاهی متاثر از حضور گوگرد در بستر پایه کود میکروبی فسفاته بوده است و افزودن گوگرد نقش افزایشی داشته است. مقدار جذب پتاسیم در بخش هوایی در تیمار کود میکروبی حاوی گوگرد در مقایسه با کنترل منفی (فاقد باکتری) ۳۵/۰۱ و ۳٦/٤۳ درصد افزایش در دو سطح ۰/٦ و ۱/۲ گرم نشان داد و این در حالی است که حذف گوگرد از این تیمار باعث کاهش ۳۵/۰۸ و ۲٤/۸٤ درصدی شد (شکل ۱۳). اما در بخش ریشه وجود و عدم وجود گوگرد در کود میکروبی تفاوت فاحشی را در مقدار جذب پتاسیم در ریشه ایجاد کرده است به صورتی که تیمار باکتریایی بدون گوگرد, تقریباً با تیمارهای شاهد هم‌گروه هست ولی افزودن گوگرد به کود میکروبی باعث افزایش پارامتر مورد اندازه‌گیری تا ٥٤/۹٥ و ٦۰/۷۱ درصد به ترتیب در ۰/٦ و ۱/۲ گرم شده است (شکل ۱٤).



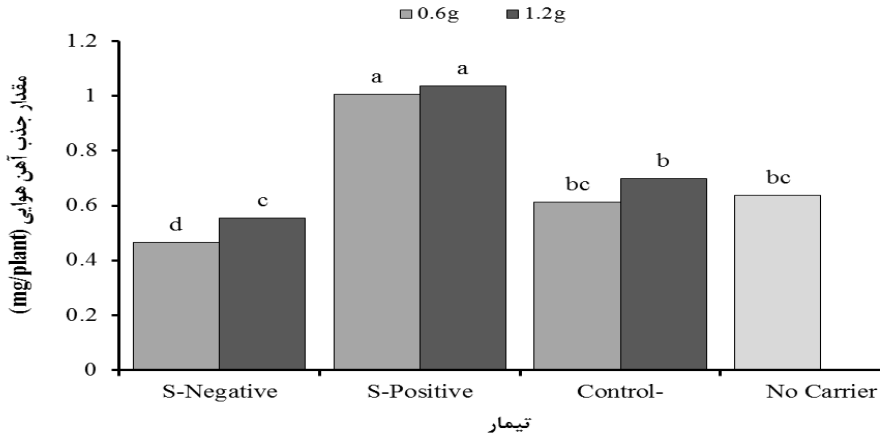
شکل ۱۳- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر مقدار پتاسیم بخش هوایی ذرت



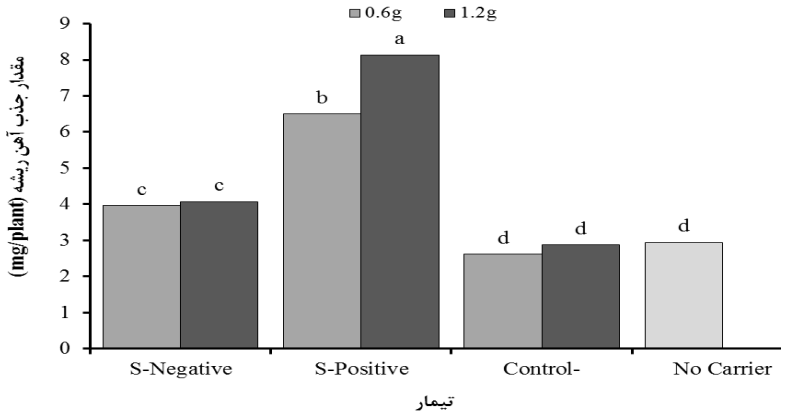
شکل ۱۴- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر مقدار پتاسیم بخش ریشه ذرت

مقدار جذب آهن بخش هوایی و ریشه

مقدار جذب آهن در گیاه ذرت تحت تاثیر وجود گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. مطابق شکل ۱۵ در صورت عدم مصرف گوگرد، مقدار جذب آهن بخش هوایی کاهش معناداری نشان می‌دهد به طوری که منجر به کاهش این پارامتر در حد پایین‌تر از تیمارهای شاهد (کنترل منفی و بدون بستر کود میکروبی فسفاته) می‌گردد. تیمار باکتریایی بدون گوگرد *P. fluorescens* از نظر آماری دارای سطح عملکردی پایین‌تری نسبت به تیمار باکتریایی *P. fluorescens* به همراه گوگرد و تیمارهای شاهد بود. در شکل زیر آهن بخش هوایی متاثر از حضور گوگرد بوده و در حضور آن غلظت آهن در بخش هوایی افزایش یافته است. مطابق شکل ۱۵ شرایط جذب عنصر آهن در بخش هوایی و نیز در بخش ریشه (شکل ۱٦) تحت تاثیر وجود گوگرد در کود میکروبی فسفاته قرار گرفته است و اثر باکتری *P. fluorescens* در جذب آهن ریشه بیش از بخش هوایی بود. حضور گوگرد در فرمولاسیون کود میکروبی در مقایسه با عدم وجود گوگرد چه در بخش هوایی و چه در بخش ریشه باعث افزایش مقدار جذب آهن به میزان دوبرابر شده است.



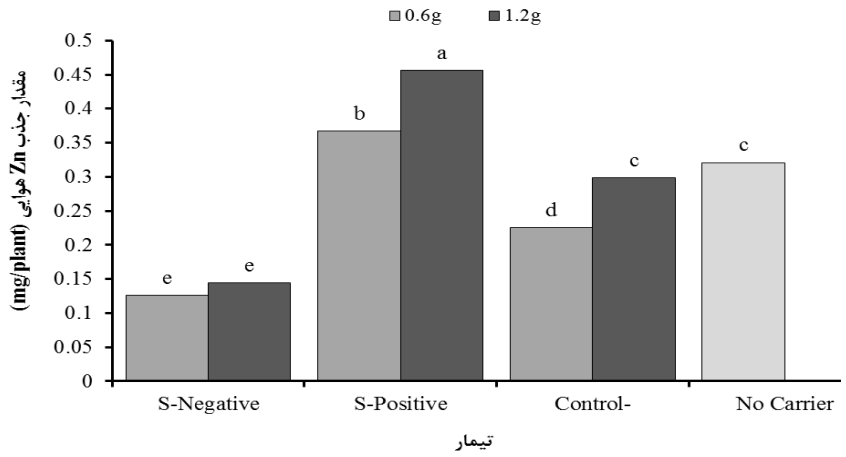
شکل ۱۵- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر مقدار آهن بخش هوایی ذرت



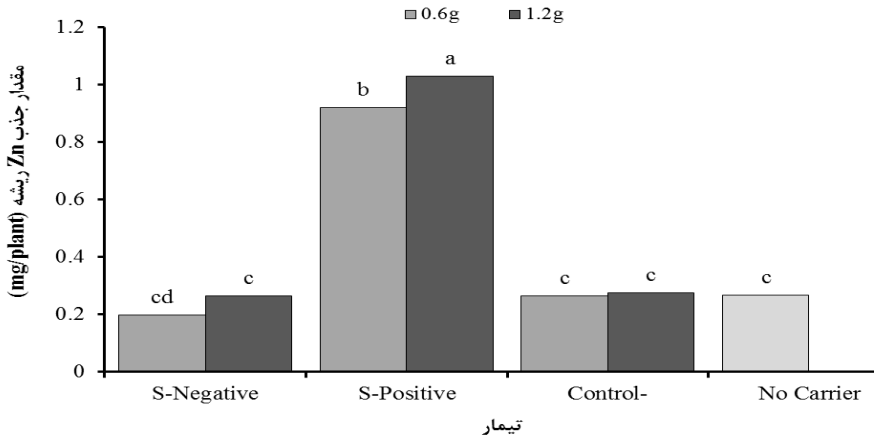
شکل ۱۶- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر مقدار آهن بخش ریشه ذرت

مقدار جذب روی بخش هوایی و ریشه

مقدار جذب Zn در بافت گیاهی تحت تاثیر تیمارهای مورد استفاده در آزمایش قرار داشت و اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت. مقایسه میانگین انجام شده نشان داد که مقدار جذب بخش هوایی (شکل ۱۷) و جذب بخش ریشه (شکل ۱۸) تحت حضور گوگرد در فرمولاسیون کود میکروبی بوده است و به ترتیب باعث افزایش بیش از سه و پنج برابری در آنها شده است. تیمار باکتریایی بدون گوگرد *P. fluorescens* از نظر آماری دارای سطح عملکردی پایین‌تری نسبت به تیمار باکتریایی *P. fluorescens* به همراه گوگرد و تیمارهای شاهد بود.



شکل ۱۷- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر مقدار Zn بخش هوایی ذرت



شکل ۱۸- تاثیر حضور گوگرد در کودهای میکروبی فسفاته بر مقدار Zn بخش ریشه ذرت

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که همه پارامترهای اندازه‌گیری شده در این تحقیق اعم از وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی، ارتفاع ساقه، مقدار و جذب فسفر، پتاسیم آهن و روی بخش ریشه و بخش هوایی ذرت متاثر از کاربرد باکتری و کاربرد عنصر گوگرد در کود میکروبی فسفاته بوده است. آنچه از نتایج برمی‌آید آن است که استفاده همزمان باکتری و گوگرد بالاترین میانگین‌ها را به همراه داشته است. به صورتی که منجربه افزایش وزن خشک کل به بیش از ٤٠ درصد شد و مقدار جذب فسفر در بخش هوایی و ریشه به ترتیب بیش از ۳۵ و ٦٥ درصد درمقایسه با تیمار شاهد کنترل منفی افزایش یافت. لازم به ذکر است که در مورد پارامترهای قطر ساقه و غلظت عنصر پتاسیم، کاربرد گوگرد از نظر آماری معنی‌دار نشد ولی جذب عنصر پتاسیم تحت اثر گوگرد افزایش یافت. همانطور که مشاهده شد استفاده از عنصرگوگرد در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته باعث افزایش اثرات محرک رشدی آن بر روی گیاه شده و لذا به نظر می‌رسد که این عنصر بایستی بخش ثابت در فرمولاسیون کودهای میکروبی در نظر گرفته شود. البته ممکن است اثر گوگرد در کود میکروبی باتوجه به ریزجاندار به کار برده شده متفاوت باشد ولی در

جمع‌بندی بایستی عنوان کرد که استفاده از گوگرد به دلایل زیادی اعم از اثرات مستقیم (اثر تغذیه‌ای روی گیاه) و غیر مستقیم (تاثیر بر قابلیت دسترسی سوبسترای آن (فسفات کم محلول) از طریق تاثیر بر pH) در فرمولاسیون کود میکروبی می‌تواند کاملاً مفید باشد. مصرف گوگرد به همراه اکسیداسیون بعدی آن با کاهش موضعی pHاطراف منطقه ریزوسفر ریشه موجب بهبود حلالیت عناصر تثبیت‌شده در خاک‌های آهکی شده که در نتیجه افزایش جذب‌عناصر توسط گیاه را به دنبال دارد (بشارتی ۲۰۰۱). لذا در کنار ویژگی این نوع باکتری‌ها و همراه بودن گوگرد با آن‌ها با توجه به بالابودن میزان آهک خاکهای ایران و فراوانی گوگرد در کشور، مصرف این ماده در خاک نه تنها باعث اصلاح خواص خاک و افزایش عملکرد محصولات کشاورزی می گردد، بلکه موجبات افزایش راندمان کودهای کم مصرف و فسفره را نیز فراهم می آورد (بشارتی و صالح راستین ۲۰۰۰).

منابع مورد استفاده

Adesemoye AO and Kloepper JW, 2009. Plant microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology 85: 1–12.

Besharati H, Saleh Rastin N, 2000. Study of *Thiobacillus* bacterial inoculation effects along with sulfur to increase the absorption of phosphorus. Journal of Soil and Water Sciences, 13(23), 1-39 (In Persian).

Besharati H, 2001. Preparing appropriate medium for *Thiobacillus* and study of its interaction with VAM and grain yield of wheat. PhD Thesis, TarbiatModarres University 212 pp. (In Persian with English Summary)

Besharati Kelaye H, 1999. Study effects of sulfur application with the *Thiobacillus* species at increase the absorption of some elements in the soil. MA thesis of Soil Science. Faculty of Agriculture, Tehran University.

Cifuentes FR, and Lindemann WC, 1993. Organic matter stimulation of elemental sulfur oxidation in calcareous soil. Soil Science Society of America Journal. 57:727-731.

Ghorbani Nasr Abadi R, 2002. Study of sulfur application and *Thiobacillus* and *Bradyrhizobium* inoculation on nitrogen fixation and growth indices of soybean. Journal of Soil and Water 16(2): 171-178. (In Persian with English Summary)

Kachhave KG, Gawand SD and Kohire OD, 1997. Uptake of nutrients by chickpea, J. Indian Soc. Soil Sci. 45: 590-591.

Kaplan M and Orman S, 1988. Effect of elemental sulfur and containing waste in a calcareous soil in Turkey. J. Plant Nutr. 21: 1655-1665.

Khan MS, Zaidi A and Wani PA, 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review.Agronomy for sustainable development. Agron. Sustain. 27:29–43.

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

Koochekzadeh Y, 2003. Effect of S and *Thibacillus* and organic matter on required P of corn in calcorus soils. MSc Thesis. TarbiatModarres University, Tehran, Iran. (In Persian with English Summary)

Leach AW and Mumford JD, 2008. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. Environ Pollut. 151:139–147

Malakoti MJ, 1995. Sustainable agriculture and increase performance by optimizing the use of fertilizers in Iran. dissemination of agricultural education. Karaj. Iran. (In Persian).

Modaihsh S, Mustafa AAL and Metwally AE, 1989. Effect of elemental sulfur on chemical changes and nutrient availability in calcareous soils. Plant and Soil, 116:95-101.

Nelson DW, Sommers LE, Page AL, Miller RH and Keeney PR ,1982. Total carbon, organic carbon and organic matter, Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and mic-obiological properties. Soil Science Society of America 539-580.

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

Paul EA, 2007. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. 3ed Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier .

Rashidi N and Karimian NA, 2000. The effects of sulfur and zinc on growth and chemical composition of corn in a calcareous soil. The proceeding of the 6th congress of Soil Science of Iran, Mashhad.

Salardini AA, 1995. Soil Fertility. Publication of Tehran University, Tehran, Iran. (In Persian).

Sarikhani MR, Malboobi MA and Ebrahimi M, 2014. Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of Bacteria and Phosphate Solubilizing Genes, Mechanism and Genetics of Phosphate Solubilization. Journal of Agricultural Biotechnology. 6(1): 76-110. (In Persian).

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

Vessey JK, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255: 571–586.

Waling I, Vark WV, Houba VJG and Vanderlee JJ, 1989. Soil and Plant Analysis, a series of syllabi. Part 7. Plant Analysis Procedures. Wageningen Agriculture University, Netherland.

Wang YP, QB Li, Hui W, Shi JY, Lin Q, Chen XC and YX Chen, 2008. Effect of sulfur on soil Cu/Zn availability and microbial community composition. Journal of Hazardous Materials 159: 385-389.

Ziaeyan A, Salim-pour S, Silsipour M and Safari H, 2010. Evaluation of some bio and chemical P- fertilizers in corn. The 1st Iranian Fertilizer Challenges Congress Half a Century of the Fertilizer Consumption. (In Persian).