

افزایش کارایی خاک فسفات با استفاده از برخی ریز جانداران بومی باغ‌های پسته برای بهبود رشد و تغذیه دانهال پسته در تنش شوری

مهدی سرچشمه پور¹، حسین بشارتی و غلامرضا ثواقبی

استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه شهید باهنر کرمان؛ msarcheshmeh@uk.ac.ir

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ hbesharati@yahoo.com

استاد پردیس کشاورزی دانشگاه تهران؛ savagheb@ut.ac.ir

دریافت: 91/11/27 و پذیرش: 94/7/11

چکیده

تبدیل خاک فسفات به کودهای فسفوری بر هزینه است و مصرف آنها همواره خطر آلودگی خاک از طریق تجمع عناصری مثل کادمیم را نیز به دنبال دارد. در صورتی که بتوان قابلیت جذب و فراهمی فسفر خاک فسفات را افزایش داد، تحویلی بزرگ در تغذیه فسفوری گیاهان رخ خواهد داد. در این تحقیق پتانسیل استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تیوباسیلوس بومی باغات پسته برای افزایش کارایی خاک فسفات و بهبود شرایط تغذیه‌ای نهال پسته مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل، شامل 5 تیمار تلقیح و 3 سطح شوری بود که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار اجرا شد. تیمارهای تلقیح شامل شاهد بدون کود و تلقیح (T1)، خاک فسفات (T2) خاک فسفات همراه با دو جدایه حل‌کننده فسفات شامل *P. thivervalensis* (T3) و *Pantoea dispersa* (T4) و خاک فسفات همراه با گوگرد، دو جدایه حل‌کننده فسفات و سه جدایه تیوباسیلوس (T5) و سطوح شوری شامل S0، S1 و S2، به ترتیب با مقادیر عددی 3، 8 و 16 دسی زیمنس بر متر بودند. با توجه به نتایج بدست آمده، افزایش شوری باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، میانگین ارتفاع و تعداد برگ به ازاء نهال، مقدار جذب عناصر فسفر و آهن شد و بر غلظت فسفر و مقدار جذب روی تأثیر معنی‌داری نداشت. تیمارهای باکتری تأثیر معنی‌داری بر وزن تر و خشک اندام هوایی، میانگین ارتفاع و تعداد برگ، غلظت فسفر و آهن و میزان جذب عناصر فسفر، آهن و روی داشتند. استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات به همراه خاک فسفات بیشترین تأثیر مثبت را بر وزن تر و خشک اندام هوایی و میانگین ارتفاع و تعداد برگ به ازاء نهال داشت و صفات فوق را نسبت به تیمار شاهد به ترتیب 36/1، 37/8، 11/5 و 27/1 درصد افزایش داد. استفاده از باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد به همراه خاک فسفات و گوگرد (T4)، و نیز مخلوط حل‌کننده‌های فسفات و اکسیدکننده‌های گوگرد به همراه خاک فسفات و گوگرد (T5) بیشترین تأثیر را از نظر غلظت و مقدار جذب فسفر ایجاد کرد. تیمار T4 از نظر غلظت و مقدار جذب فسفر و تیمار T5 از نظر مقدار فسفر در تمام سطوح شوری اختلاف معنی‌داری را با شاهد بدون تلقیح داشتند. اگر چه مصرف خاک فسفات به تنهایی نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش غلظت و مقدار جذب فسفر شد، اما اثر این تیمار با اختلاف معنی‌داری کمتر از تیمارهای تلقیح با باکتری‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده فسفات، تیوباسیلوس، خاک فسفات، گوگرد، تلقیح

¹ نویسنده مسئول، آدرس: کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و مهندسی خاک

مقدمه

پسته با سطح زیر کشت حدود 477/6 هزار هکتار از جمله مهمترین محصولات کشاورزی است که حدود 80 درصد سطح زیر کشت و تولید آن مربوط به استان کرمان می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، 1392). شرایط خاص حاکم بر باغ‌های پسته از جمله آهکی بودن خاک‌ها و pH بالای آن‌ها، تغذیه این درختان را دچار مشکل نموده است (مهرنژاد و جوانشاه، 1389). کودهای فسفوری در خاک-های آهکی دارای بازده کمی می‌باشند و بررسی‌ها نشان داده که بازده آن‌ها از 20 درصد تجاوز نمی‌کند (اسپینک و باربر، 1947 و تیسدل، 1993). از طرف دیگر تبدیل خاک فسفات به کودهای فسفوری نیازمند صرف هزینه و انرژی می‌باشد. مصرف مستقیم خاک فسفات دارای کارایی لازم نبوده و در صورتی که بتوان با اعمال روش‌های مناسب و کارآمد قابلیت جذب و فراهمی فسفر آن را افزایش داد، تحول بزرگی در تغذیه فسفوری گیاهان خواهد بود.

میکروارگانیزم‌های حل‌کننده فسفات همواره در خاک حضور داشته و می‌توانند نقش مهمی را در تأمین فسفر مورد نیاز گیاه به طور پایدار ایفا کنند. این میکروارگانیزم‌ها شامل قارچ‌ها و باکتری‌های زیادی هستند که می‌توانند در محیط‌های حاوی تری کلسیم فسفات، فسفات‌های آهن و آلومینیم، هیدروکسی آپاتیت، پودر استخوان، سنگ فسفات و ترکیبات نامحلول مشابه به عنوان تنها منبع تأمین فسفر رشد کنند (گیانشوار و همکاران، 2002؛ تیلک و ردی، 2006). توانایی این میکروارگانیزم‌ها در حل کردن ترکیبات پیچیده فسفات-های کلسیم، به واسطه کاهش pH از طریق ترشح H^+ و یا ترشح اسیدهای آلی (استات، لاکتات، اکسلات، تارتارات، سوکسینات، سیترات، گلوکونات، کتوگلوکونات، گلیکولات و...) می‌باشد. اسیدهای آلی ترشح شده می‌توانند فسفر را از طریق حل کردن مستقیم فسفات‌های معدنی ناشی از تبادل آنیون فسفات با آنیون اسید و یا از طریق کلات کردن آهن و آلومینیم موجود در فسفات‌ها آزاد کنند. منابع کودهای فسفات در دنیا محدود، تولید آن-ها پرهزینه و مصرف بی‌رویه آن‌ها در بسیاری از نقاط دنیا باعث تجمع و تثبیت مقادیر قابل توجهی فسفر در اراضی کشاورزی شده است (گیانشوار و همکاران، 2002).

زادمایه میکروارگانیزم‌های حل‌کننده فسفات شامل گونه‌هایی از قارچ *Aspergillus* و باکتری‌های *Arthrobacter*، *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Escherichia* هستند که می‌توانند 30 تا 35 کیلوگرم P_2O_5 قابل جذب را به هر هکتار خاک اضافه کنند. برخی از گونه‌ها به شرایط نامساعد محیطی نیز مقاوم می‌باشند، به

عنوان مثال سویه‌های باکتریایی از ریزوسفر گیاه نخود از خاک‌های قلیایی جدا شده که توانسته‌اند فسفر را در حضور 10 درصد نمک، pH برابر 12 و درجه حرارت 45 درجه سانتیگراد حل کنند (تیلک و همکاران، 2005). سویه‌هایی از باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *B. circulans* نیز مقاوم به حرارت بوده و توانسته‌اند مقادیر قابل توجهی از تری کلسیم فسفات را در درجه حرارت 45 درجه سانتیگراد حل کنند. تلقیح بذره‌های گیاه ماش با این سویه‌ها باعث بهبود گره‌بندی، افزایش فسفر قابل جذب خاک، افزایش وزن ریشه و اندام هوایی، افزایش وزن کاه و جذب بهتر نیتروژن و فسفر شد (گایند و گائور، 1991).

جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* از مهمترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات‌های نامحلول می‌باشند (تیلک و همکاران، 2005). احمد و همکاران (2006) 72 جدایه‌ای از باکتری‌های مختلف ریزوسفری را مورد بررسی قرار دادند که بیش از 80 درصد از باکتری‌های جنس *باسیلوس* و 55/5 درصد از باکتری‌های جنس *سودوموناس*، حل‌کننده فسفات بودند. در هندوستان از میان باکتری‌های PGPRs متعدد جدا شده از ریزوسفر ذرت، سویه‌هایی از *Bacillus cereus* و *B. circulans* به عنوان سویه‌های برتر معرفی شده‌اند. این سویه‌ها اندوفیت، تولیدکننده سیدروفور و حل‌کننده فسفات بودند و توانستند در دمای 45 درجه سانتیگراد، در حضور 7 درصد کلرید سدیم و در محدوده pH=5/7-9/9 به خوبی رشد کنند. این باکتری‌ها روی حامل مناسب در حرارت 30 درجه با جمعیت 10^8 به ازاء هر گرم از مایه تلقیح به مدت بیش از یکسال باقی ماندند. تلقیح گیاه ذرت با این سویه‌ها عملکرد دانه را در شرایط مزرعه به ترتیب 43/8 و 42/9 درصد در مقایسه با شاهد تلقیح نشده افزایش داد. افزایش عملکرد برای گندم به ترتیب 38/1 و 42/9 و برای لوبیای سودانی¹ 38/6 و 41/3 درصد بود (نتوتا، 2005). فرناند و همکاران (2007) 13 سویه باکتری با توان حل‌کنندگی تری کلسیم فسفات در محیط مایع و جامد را از 5 خاک زیر کشت سویا جداسازی و اثر سه سویه برتر را بر رشد و جذب عناصر در گیاه سویا در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار دادند. هیچ یک از سویه‌ها نتوانستند جذب فسفر توسط گیاه را افزایش دهند.

گوگرد نیز یکی از محصولات جانبی صنایع نفت و گاز است که سالانه بیش از یک میلیون تن در کشور

¹ pigeon pea

عقیده بر این است که جداسازی و مطالعه جدایه‌های بومی که با محیط سازگار شده‌اند می‌تواند منجر به تولید زادمایه‌هایی شود که برای محصولات آن منطقه کارآیی بیشتری نسبت به جدایه‌های غیر بومی داشته باشند (فیش و همکاران، 2007). به نظر می‌رسد با استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تیوباسیلوس بومی باغ‌های پسته که با شرایط منطقه سازگار شده‌اند همراه با خاک فسفات و گوگرد بتوان قابلیت جذب فسفر موجود در خاک فسفات را افزایش و به تغذیه فسفوری گیاه کمک نمود. این تحقیق به منظور بررسی تأثیر کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تیوباسیلوس بومی و گوگرد در افزایش کارآیی خاک فسفات و بهبود شرایط تغذیه‌ای نهال پسته در شرایط تنش شوری طرح ریزی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل، شامل 5 تیمار تلقیح و 3 سطح شوری بود که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار در شرایط گلخانه اجرا گردید. سطوح شوری شامل S0، S1 و S2، به ترتیب با مقادیر عددی 3، 8 و 16 دسی زیمنس بر متر و تیمارهای مایه‌زنی با جدایه‌ها به شرح زیر اعمال شدند.

- 1- (T1) شاهد منفی (بدون تلقیح، بدون کود)
- 2- (T2) خاک فسفات (معادل 35 میکروگرم فسفر به ازاء هر گرم خاک، که مشخصات آن در جدول 1 ارائه شده است)
- 3- (T3) تلقیح با دو جدایه حل‌کننده فسفات + خاک فسفات
- 4- (T4) تلقیح با سه جدایه تیوباسیلوس + خاک فسفات + گوگرد
- 5- (T5) تلقیح با حل‌کننده‌های فسفات و تیوباسیلوس + خاک فسفات + گوگرد

انتخاب سویه‌های مورد استفاده

سویه‌های مورد استفاده شامل دو سویه حل‌کننده فسفات مربوط به گونه‌های *Pantoea dispersa* و *P. thivervalensis* (سرچشمه‌پور، 1388) و سه جدایه اکسیدکننده گوگرد مربوط به جنس *Thiobacillus sp.* (ثواقبی و همکاران، 1393) بودند. سویه‌های حل‌کننده فسفات‌های نامحلول دارای توانایی قابل توجهی از نظر کاهش pH و تحمل شوری در محیط اسپربر معدنی و آلی بودند. سویه‌های تیوباسیلوس نیز دارای توانایی قابل توجهی از نظر اکسایش تیوسولفات (محیط پستگیت) و گوگرد عنصری، کاهش pH و نیز تحمل شوری در محیط کشت مربوطه بودند (جدول 2). صفات انتخابی فوق از

تولید می‌شود (امیرمکری و ملکوتی، 1382). استفاده از این ماده هنگامی اثربخش و مفید خواهد بود که در خاک به مقدار و سرعت کافی اکسید گردد. اکسیداسیون گوگرد عمدتاً بیولوژیکی بوده و باکتری‌های تیوباسیلوس از جمله مهمترین اکسیدکنندگان این ماده می‌باشند. این باکتری‌ها با اکسیداسیون گوگرد، علاوه بر تأمین انرژی مورد نیاز خود، تولید اسید سولفوریک کرده و pH محیط را کاهش می‌دهند (ویدیا لاکشمی و سرایداری، 2007؛ یانگ و همکاران، 2008). استفاده از گوگرد در اراضی کشاورزی و ایجاد شرایط مناسب برای اکسیداسیون آن می‌تواند امکان مصرف خاک فسفات تولید داخل را در شرایط خاک‌های ایران فراهم و موجب افزایش کارایی و انحلال انواع کودهای شیمیایی و همچنین آزادسازی منابع ذخیره‌ای کودهای مصرف شده در سال‌های قبل گردد (بشارتی کلایه، 1377؛ سلیم‌پور و همکاران، 1384). مهمترین باکتری‌های شیمیولیتوتروف اکسیدکننده گوگرد در اکثر خاک‌ها متعلق به جنس تیوباسیلوس می‌باشند (بشارتی کلایه، 1377؛ و این‌رایت، 1994).

بشارتی کلایه (1377) اثر تلقیح باکتری‌های تیوباسیلوس و مصرف گوگرد را بر افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی گیاه ذرت در شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار داد. نتایج این تحقیق نشان داد، استفاده از زادمایه تیوباسیلوس همزمان با مصرف گوگرد باعث افزایش عملکرد اندام هوایی، کاهش معنی‌دار pH خاک، آزاد شدن فسفر و آهن از خاک و افزایش جذب این عناصر توسط گیاه شد. مصرف گوگرد 36/5 درصد و مصرف توأم گوگرد و زادمایه باکتری 137/2 درصد مقدار آهن جذب شده توسط گیاه را نسبت به شاهد افزایش داد. گوگرد به تنهایی 56/8 درصد و مصرف توأم گوگرد و زادمایه 59 درصد مقدار جذب روی را کاهش داد که احتمالاً ناشی از اثرات آنتاگونیستی فسفر و روی می‌باشد.

در یک بررسی مشابه، سه سطح آپاتیت (0، 500 و 1000 mg/kg)، سه سطح گوگرد (0، 50 و 100 mg/kg)، مخلوطی از سطوح مختلف گوگرد و آپاتیت با و بدون باکتری تیوباسیلوس در کشت یک گیاه لگوم مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که عملکرد و فسفر جذب شده توسط گیاه در تیمار گوگرد + تیوباسیلوس + آپاتیت حداکثر بود. لذا در این پژوهش پیشنهاد شد با توجه به اینکه تولید سوپر فسفات از خاک فسفات با عیار کم فسفر، از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد، لذا می‌توان از مخلوط گوگرد + آپاتیت و باکتری تیوباسیلوس به عنوان یک کود فسفوری بیولوژیک استفاده کرد (پاتیرانتا و همکاران، 1989).

نظر کارایی سویه‌های مورد استفاده برای افزایش حلالیت و قابلیت جذب فسفر خاک فسفات در شرایط شور از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشند.

جدول 1- نتایج تجزیه شیمیایی خاک فسفات (تهیه شده از معدن آذرین چادرملو)

واحد	خصوصیات	واحد	خصوصیات
درصد	38	درصد	10
(mg kg^{-1})	2	درصد	2/3
درصد	0	درصد	37
درصد	0	درصد	3/6
(dS m^{-1})	5/1	درصد	5/1
-	7/6	درصد	0/7
		(mg kg^{-1})	3/9

جدول 2- برخی مشخصات سویه‌های مورد استفاده در تیمارهای تلقیح

مشخصات جدایه‌های تیوباسیلوس*				مشخصات سویه‌های حل‌کننده فسفات		
T29	T8	T2	کد سویه	<i>P. thivervalensis</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	نام سویه
3/25	3/41	3/60	متوسط pH محیط پستگیت	3/80	2/79	pH محیط اسپربر معدنی
3/50	3/59	3/57	متوسط pH محیط گوگرد	3/59	2/67	pH محیط اسپربر آلی
6/84	6/84	6/84	متوسط pH محیط شاهد	6/45	6/45	pH محیط شاهد
400	400	400	آستانه تحمل شوری (mM NaCl)	400	600	آستانه تحمل شوری (mM NaCl)

*جدایه‌های تیوباسیلوس در قالب طرح پژوهشی دانشگاه تهران جداسازی شدند (ثوابقی و همکاران، 1393).

جمعیت تقریبی 1×10^8 سلول باکتری (cfu) در هر میلی‌لیتر زادمایه باشند. زادمایه جدایه‌های مورد استفاده در هر تیمار ابتدا به طور جداگانه تهیه و بر حسب تعداد جدایه مورد استفاده، بلافاصله قبل از استفاده به نسبت مساوی با هم مخلوط شدند. در نهایت زادمایه یکسان-سازی شده بر روی پرلیت استریل با نسبت مخلوط پرلیت و زادمایه 1 به 4 (وزنی به حجمی) به نحوی منتقل شد که جمعیت کل باکتری‌ها به ازاء هر گرم پرلیت مساوی بود. زادمایه باکتری‌ها در هنگام کاشت بذور با استفاده از مقداری از پرلیت که حاوی یک میلی‌لیتر زادمایه بود، در زیر بذور کار گذاشته شد.

کاشت بذرها

خاک مورد استفاده از لایه سطحی اراضی بکر مجاور باغ‌های پسته نزدیک منطقه داوران رفسنجان و به نحوی انتخاب شد که غلظت عناصر غذایی آن کم باشد.

تهیه زادمایه جدایه‌های برتر

دو سویه حل‌کننده فسفات از بین 100 جدایه و سه سویه اکسیدکننده گوگرد از بین 31 جدایه که از 30 نمونه مرکب مربوط به باغ‌های پسته شهرستان‌های رفسنجان، سیرجان، زرنده و کرمان جداسازی شده بودند، غربالگری و انتخاب گردیدند. در هر دو گروه، جدایه‌هایی انتخاب شدند که بر اساس نتایج غربالگری آزمایشگاهی، دارای توانایی قابل توجهی از نظر کاهش pH و تحمل شوری در محیط کشت بودند (جدول 2). زادمایه جدایه‌های مورد آزمایش در تیمارهای تلقیح برای باکتری‌های حل‌کننده فسفات با استفاده از محیط NB¹ و برای باکتری‌های تیوباسیلوس با استفاده از محیط پستگیت و روش کدورت سنجی به نحوی تهیه شدند که دارای

¹ Nutrient Broth

S2 بود که همراه با آب آبیاری به گلدان‌ها اضافه شدند. در طول دوره رشد، آبیاری گلدان‌ها در دامنه رطوبتی 80-50 درصد آب قابل استفاده از طریق توزین گلدان‌ها به نحوی انجام شد که هیچگونه تنش رطوبتی به گیاه وارد نشود. بعد از اعمال تیمارهای شوری، تعداد نهال‌ها به 6 نهال یکنواخت در هر گلدان کاهش یافت و گلدان‌ها به مدت حدود 4/5 ماه تحت تنش شوری کامل مربوطه بودند.

برداشت و تجزیه نمونه‌ها

پس از رشد کافی نهال‌ها طی یک دوره 6 ماهه، ابتدا تعداد برگ و ارتفاع هر نهال برای هر گلدان اندازه‌گیری شد. سپس ریشه و اندام هوایی گیاه به طور جداگانه برداشت و عملکرد تر و خشک اندام هوایی اندازه‌گیری شدند. نمونه‌ها به منظور تعیین غلظت عناصر بوسیله آسیاب برقی پودر گردیدند و تهیه عصاره گیاه با استفاده از روش سوزاندن خشک² و سپس ترکیب با اسید کلریدریک¹ نرمال انجام شد. اندازه‌گیری فسفر با روش زرد مولیدات-وانادات با استفاده از دستگاه اسپکترو فوتومتر و تعیین مقدار آهن و روی با استفاده از دستگاه جذب اتمی صورت گرفت (کوتی، 1980). مقدار عددی جذب کل هر یک از عناصر با استفاده از حاصلضرب غلظت عنصر در وزن ماده خشک مربوط به آن محاسبه گردید. در نهایت تجزیه واریانس داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS و انجام مقایسه میانگین آنها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت

نتایج و بحث

وزن تر و خشک اندام هوایی

تأثیر سطوح شوری، تیمارهای باکتری و اثرات متقابل بین شوری و باکتری بر وزن تر و خشک اندام هوایی معنی‌دار شد. میانگین وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه در همه تیمارها با افزایش سطح شوری به طور معنی‌داری کاهش یافت. با توجه به نتایج مقایسه میانگین حاصل از آزمون دانکن (جدول 3)، بیشترین وزن تر و خشک اندام هوایی به ترتیب 36/51 و 16/58 گرم مربوط به تیمار T3S0 و کمترین آن به ترتیب 18/85 و 8/40 گرم مربوط به تیمار T2S2 بود. با افزایش شوری تأثیر تیمارهای باکتری کاهش یافت، اما در سطح شوری S1 تیمار T3 و در سطح شوری S2 تیمار T5 بیشترین وزن تر و خشک اندام هوایی را داشتند (جدول 3). در تحقیقات سپاسخواه و مفتون (1988) کاهش 50 درصدی وزن

مقدار 6/2 کیلوگرم خاک الک شده به ازاء هر گلدان توزین و درون کیسه‌های پلاستیکی ریخته شد. خاک انتخابی دارای بافت شن لومی، pH آن 8/01، EC برابر 0/53 دسی زیمنس بر متر و مقدار فسفر کل، فسفر، آهن و روی قابل جذب آن به ترتیب 670، 3/3، 2/2 و 0/42 میکروگرم بر گرم خاک بود. ابتدا خاک فسفات به خوبی پودر شد و پس از عبور از الک 60 مش، به میزان 35 میکروگرم فسفر به ازاء هر گرم خاک توزین و به داخل کیسه‌های خاک مربوطه اضافه شد. گوگرد پودری نیز به میزان 3 گرم به ازاء هر کیلوگرم خاک به تیمارهای حاوی تیوباسیلوس اضافه گردید و به خوبی مخلوط شد. دیگر کودهای مورد نیاز بر اساس آزمون خاک و به صورت محلول تهیه و با پیست همراه با آب کافی به خاک اضافه شدند. گلدان‌ها تا حد ظرفیت مزرعه¹ آبیاری شدند و پس از متعادل شدن رطوبت، در هر گلدان تعداد 12 بذر جوانه دار شده رقم بادامی ریز زرنند کشت شد. بذور از موسسه تحقیقات پسته تهیه شد و برای جوانه‌دار شدن، ابتدا بذور فاقد پوست به مدت 5 دقیقه در محلول وایتکس 10 درصد ضد عفونی شدند و بعد از شستشو با آب مقطر کافی، به مدت 24 ساعت در ظرف حاوی آب مقطر قرار داده شدند و آب آنها چهار نوبت تعویض شد. سرانجام بذور به مدت سه روز در یک پارچه نمناک در دمای 28 درجه سانتیگراد در انکوباتور نگهداری و جوانه‌دار شدند. گلدان‌ها به مدت 3 هفته به مقدار کافی آبیاری و سپس تعداد نهال‌ها به 8 عدد نهال یکنواخت در هر گلدان کاهش داده شد.

اعمال تیمارهای شوری

اعمال تنش شوری 3 هفته بعد از سبز شدن بذرها با استفاده از محلول 100 میلی مولار مخلوط کلریدهای سدیم (NaCl)، کلسیم (CaCl₂.2H₂O) و منیزیم (MgCl₂.6H₂O) با شوری حدود 12 dS/m و SAR برابر 13 به تدریج طی 8 مرحله و به صورت یک روز در میان انجام شد. میزان کلریدهای سدیم، کلسیم و منیزیم در محلول 100 میلی مولار به ترتیب 70/5، 20 و 9/5 میلی مول در لیتر بود که به ترتیب 70/5، 20 و 9/5 درصد از محلول نمکی را به خود اختصاص دادند. نسبت‌ها با بررسی نتایج تجزیه یکهزار نمونه آب آبیاری مربوط به باغ‌های پسته (حسینی فرد و میرزایی امینیان، 2015) و به نحوی انتخاب شدند که SAR محلول برابر 13 و فاقد مشکلات ناشی از زیاده‌ای سدیم برای خاک گلدان‌ها باشد. حجم محلول مصرفی برای تیمار S1 در هر نوبت نصف

² Dry Ashing

¹ Field Capacity : F.C

ریشه و اندام هوایی، افزایش وزن کاه و جذب بهتر نیتروژن و فسفر شد (گایند و گائور، 1991).

وزن تر و خشک ریشه

تأثیر سطوح شوری بر وزن تر و خشک ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار گردید، اما تأثیر تیمارهای باکتری و اثرات متقابل شوری و باکتری معنی‌دار نشد. میانگین وزن تر ریشه در سطوح S1 و S2 به ترتیب 21/8 و 41/1 درصد و میانگین وزن خشک آن به ترتیب 18/6 و 36/9 درصد نسبت به سطح S0 طبق آزمون دانکن کاهش یافت (جدول 4). در تحقیقات سپاسخواه و مفتون (1988) کاهش 50 درصدی وزن خشک و توقف رشد ریشه برای رقم بادامی به ترتیب در EC برابر 10 و 20/6 دسی زیمنس بر متر صورت گرفت. پیکچونی و همکاران (1990) کاهش رشد ریشه و ساقه را در شوری عصاره اشباع برابر 8/7 دسی زیمنس بر متر گزارش کردند

خشک و توقف رشد اندام هوایی برای رقم بادامی به ترتیب در EC برابر 9/3 و 18/7 دسی‌زیمنس بر متر صورت گرفت. فرگوسن و همکاران (2002) کاهش وزن کل اندام هوایی را در شوری بیش از 12 دسی‌زیمنس بر متر و پیکچونی و همکاران (1990) کاهش رشد ریشه و ساقه را در شوری عصاره اشباع برابر 8/7 دسی زیمنس بر متر گزارش کردند. اسلاتاس و همکاران (2007) طی سال‌های 2002 تا 2004 اثرات تلقیح نهال‌های سیب را با چهار سوبه باکتری در ترکیه که مولد IAA و سیتوکینین و دارای توان حل‌کنندگی فسفات بودند، مورد مطالعه قرار دادند. سوبه‌ها شاخه‌زایی، طول ساقه و عملکرد میوه را در مقایسه با شاهد افزایش دادند. تلقیح بذره‌های گیاه ماش نیز با سوبه‌هایی از باکتری‌های مقاوم به حرارت که توانسته بودند مقادیر قابل توجهی از تری کلسیم فسفات را در دمای 45 درجه سانتیگراد حل کنند باعث بهبود گره‌بندی، افزایش فسفر قابل جذب خاک، افزایش وزن

جدول 3- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح شوری و تیمارهای باکتریایی بر وزن تر و خشک اندام هوایی و غلظت فسفر

تیمار باکتریایی					شوری	صفت
T5	T4	T3	T2	T1		
29/14 b-d	26/07 c-f	36/51 a	30/15 b-d	26/82 b-f	S ₀	وزن تر اندام هوایی (g/pot)
27/40 b-e	25/74 c-f	32/90 ab	31/48 a-c	24/85 d-f	S ₁	
26/66 c-f	22/00 e-g	22/02 e-g	18/85 g	21/00 fg	S ₂	
12/78 b-d	12/13 b-d	16/58 a	15/00 ab	12/03 b-d	S ₀	وزن خشک اندام هوایی (g/pot)
12/63 b-d	11/50 c-e	14/08 a-c	13/10 bc	11/48 c-e	S ₁	
12/40 b-d	9/80 de	9/65 de	8/40e	9/60 de	S ₂	
0/211 a	0/185 a	0/135 de	0/121de	0/112 e	S ₀	غلظت فسفر (درصد)
0/181 b	0/189ab	0/143cd	0/126 de	0/119 de	S ₁	
0/147 cd	0/167 bc	0/141 cd	0/133 de	0/122 de	S ₂	

میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل هر صفت که دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک هستند فاقد تفاوت معنی‌دار به روش آزمون دانکن در سطح 5 درصد می‌باشند

معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی نیز شد، اما تأثیر معنی‌داری بر وزن تر و خشک ریشه نداشت و می‌تواند عامل اصلی افزایش معنی‌دار نسبت اندام هوایی به ریشه باشد. در مطالعه پیکچونی و همکاران (1990) افزایش شوری باعث کاهش نسبت اندام هوایی به ریشه شد و در ارزیابی میزان تحمل پایه‌های پسته در مقابل تنش شوری توسط کریمی (1387) نیز میزان کاهش در شاخص‌های اندام هوایی بیش از ریشه بود.

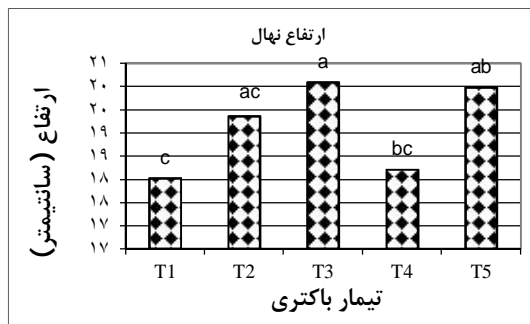
ارتفاع گیاه

تأثیر سطوح شوری و تیمارهای باکتری بر ارتفاع نهال معنی‌دار گردید ولی اثرات متقابل شوری و

نسبت وزن اندام هوایی به ریشه (S/R)

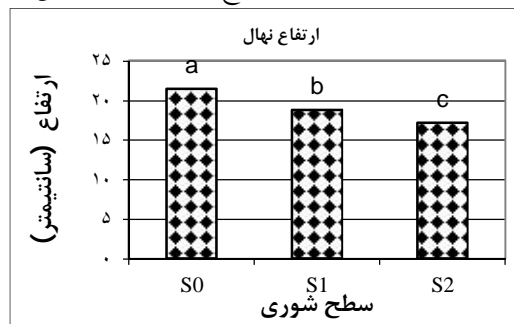
اثر سطوح شوری و جدایه‌های باکتری بر نسبت اندام هوایی به ریشه معنی‌دار ولی اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار نشد. اعمال تنش شوری باعث افزایش این نسبت شد و بین سطوح شوری اختلاف معنی‌داری از این نظر وجود نداشت. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق، اندام هوایی به میزان کمتری تحت تأثیر اثرات سوء شوری قرار گرفته‌اند در بین تیمارهای تلقیح، بیشترین نسبت مربوط به تیمارهای T3 و T5 و کمترین مربوط به تیمار شاهد بود (جدول 4). استفاده توأم باکتری‌های حل‌کننده فسفات‌های نامحلول با خاک فسفات باعث افزایش

باشد که از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند (شکل 2). بیشترین وزن تر و خشک ریشه نیز مربوط به تیمار باکتری‌های حل‌کننده فسفات (T4) بود که می‌تواند عامل تحریک رشد ارتفاع نهال باشد. باکتری‌های محرک رشد از طریق مکانیسم‌های متعددی باعث تحریک رشد می‌شوند.



شکل 2- نمودار تأثیر تیمارهای باکتری بر میانگین ارتفاع نهال

باکتری معنی‌دار نشد. با افزایش شوری میانگین ارتفاع نهال کاهش یافت، به‌گونه‌ای که در سطح S2 میزان کاهش نسبت به شاهد 20 درصد بود (شکل 1). در تحقیقات پیکچینی و همکاران (1990) رشد طولی نهال‌ها 12 هفته بعد از اعمال تنش شوری، در شوری عصاره اشباع معادل 8 به طور متوسط 33 درصد کاهش یافت. بیشترین ارتفاع مربوط به تیمار T3 با متوسط ارتفاع 20/08 و کمترین آن مربوط به تیمار T1 با متوسط ارتفاع 18/01 سانتیمتر می‌-

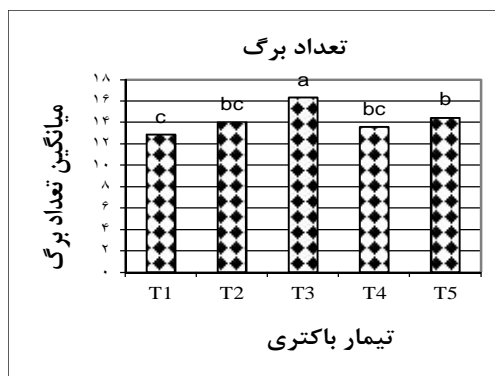


شکل 1- نمودار تأثیر سطوح شوری بر میانگین ارتفاع نهال

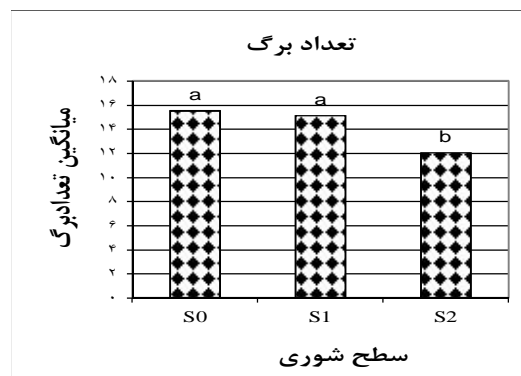
در مطالعه کریمی (1387) بسته به نوع ژنوتیپ در شوری 10 و 15 دسی زیمنس بر متر تا 50 درصد کاهش یافت. با توجه به نتایج فوق، تلقیح گیاه با باکتری‌های حل‌کننده فسفات و نیز مخلوط اکسیدکنندگان گوگرد و حل‌کنندگان فسفات باعث افزایش معنی‌دار میانگین ارتفاع نهال و تعداد برگ به ازاء نهال گردید که می‌تواند یکی از عوامل اصلی افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه باشد. معنی‌دار نشدن اثرات متقابل می‌تواند ناشی از کاهش و یا عدم کارایی باکتری‌ها در شرایط تنش شوری باشد.

تعداد برگ‌ها

تأثیر سطوح شوری و تیمارهای باکتری بر متوسط تعداد برگ نهال معنی‌دار شد لیکن اثرات متقابل شوری و باکتری معنی‌دار نگردید. افزایش شوری تا سطح S2 باعث کاهش 22/5 درصدی متوسط تعداد برگ به ازاء نهال گردید (شکل 3). بیشترین میانگین تعداد برگ 16/28 عدد به ازاء هر نهال، مربوط به تیمار T3 و کمترین آن 12/81 عدد و مربوط به T1 بود (شکل 4). سطح و تعداد برگ در مطالعه تاج آبادی‌پور (1383) با مصرف 4000mgNaCl/kg soil حداکثر تا 97 درصد و سطح برگ



شکل 4- نمودار تأثیر تیمارهای باکتری بر میانگین تعداد برگ



شکل 3- نمودار تأثیر سطوح شوری بر میانگین تعداد برگ

غلظت و جذب عناصر معدنی در اندام هوایی

غلظت و جذب کل فسفر اندام هوایی

تأثیر سطوح شوری بر غلظت فسفر اندام هوایی معنی‌دار نشد، اما اثر تیمارهای باکتری و اثرات متقابل شوری و باکتری در سطح یک درصد معنی‌دار گردید. با توجه به نتایج مقایسه میانگین، تیمار T5S0 با 0/211 درصد حداکثر و تیمار T1S2 با 0/112 درصد حداقل میانگین غلظت فسفر را داشتند. تیمار T4 در سطح S1 و S2 بیشترین غلظت فسفر را داشت (جدول 3). بنابراین با توجه به نتایج فوق، استفاده توأم باکتری‌های حل‌کننده فسفات و اکسیدکننده گوگرد تفاوت کاملاً معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد و مصرف خاک فسفات به تنهایی ایجاد کرد.

تأثیر سطوح شوری و تیمارهای باکتری بر مقدار کل فسفر جذب شده توسط اندام هوایی معنی‌دار گردید، اما اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار نشد. افزایش شوری باعث کاهش معنی‌دار میانگین مقدار کل فسفر موجود در اندام هوایی گردید. مقدار کل جذب فسفر توسط اندام هوایی در سطوح S1 و S2 به ترتیب 10/5 و 32/9 درصد نسبت به S0 کاهش یافت وزن خشک اندام هوایی در سطوح شوری S1 و S2 عامل اصلی کاهش جذب کل فسفر توسط اندام در این تیمارها می‌باشد. میانگین جذب کل فسفر توسط اندام هوایی گیاهان در تمام تیمارهای تلقیح شده با باکتری به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان تیمار شاهد تلقیح نشده بود. حداکثر میانگین مقدار فسفر جذب شده 22/7 میلی گرم به ازاء گلدان، مربوط به تیمار T5 و حداقل میانگین آن 12/3 و مربوط به تیمار شاهد بود (جدول 4). بنابراین استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات و اکسیدکنندگان گوگرد توانست کارایی خاک فسفات و جذب فسفر از این کود توسط گیاه را افزایش دهد. همچنین استفاده از مخلوط این باکتری‌ها همراه با گوگرد نیز تأثیر کاملاً معنی‌داری داشت و حداکثر مقدار فسفر جذب شده توسط نهال مربوط به این تیمار بود. تفاوت تیمارهای T4 و T5 از نظر مقدار فسفر جذب شده با شاهد بدون تلقیح در تمام سطوح شوری کاملاً معنی‌دار بود.

در بررسی‌ها و همکاران (2006)، استفاده از خاک فسفات همراه با باکتری‌های حل‌کننده فسفات باعث افزایش معنی‌دار قابلیت استفاده و میزان جذب فسفر توسط گیاه و میزان رشد لفل و خيار گردید. استفاده از باکتری‌های اسید دوست اکسیدکننده گوگرد در نیشکر نیز عملکرد و مقدار جذب عناصر فسفر، نیتروژن و پتاسیم را افزایش داد (ستامفورد و همکاران، 2006). پاتیرانتسا و

همکاران (1989) سطوح مختلف آپاتیت و مخلوط گوگرد و آپاتیت را با و بدون باکتری تیوباسیلوس در کشت یک گیاه لگوم مورد استفاده قرار داد. نتایج نشان داد که عملکرد و فسفر جذب شده توسط گیاه در تیمار گوگرد + تیوباسیلوس + آپاتیت حداکثر بود. با توجه به اینکه تولید سوپر فسفات از خاک فسفات با عیار کم فسفر، از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد، لذا می‌توان از مخلوط گوگرد + آپاتیت و باکتری تیوباسیلوس به عنوان کود فسفوری (بیوسوپر) استفاده کرد.

غلظت و جذب کل آهن اندام هوایی

تأثیر سطوح شوری و تیمارهای باکتری بر غلظت و مقدار آهن اندام هوایی گیاه معنی‌دار شد، اما اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار نگردید. افزایش شوری تا سطح S2 باعث کاهش میانگین غلظت و مقدار آهن در اندام هوایی به ترتیب به میزان 19/9 و 43/6 درصد شد (جدول 4). در مطالعه بشارتی و همکاران (1379) در یک آزمایش گلخانه‌ای اثر تلقیح همراه با گوگرد بر گیاه ذرت مورد مطالعه قرار گرفت. اثر باکتری بر عملکرد گیاه در سطح 1 درصد و بر میزان روی و آهن گیاه در سطح 5 درصد معنی‌دار شد.

غلظت و جذب کل روی در اندام هوایی

تأثیر سطوح شوری و تیمارهای باکتری بر غلظت و مقدار روی در اندام هوایی نیز معنی‌دار گردید. افزایش شوری تا سطح S2، میانگین غلظت را 26/1 درصد افزایش و مقدار روی در اندام هوایی را 9/7 درصد کاهش داد. افزایش غلظت در اثر شوری احتمالاً ناشی از کاهش عملکرد ماده خشک باشد. حداقل میانگین غلظت و مقدار روی در اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد بود و سایر تیمارها با اختلاف معنی‌دار نسبت به شاهد در یک سطح آماری قرار گرفتند (جدول 4).

قربانی (1380) تأثیر باکتری تیوباسیلوس را به همراه مصرف گوگرد بر توان تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در سیستم همزیستی سویا- برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم در سه نوع خاک مورد مطالعه قرار داد. اثر تیمار باکتری تیوباسیلوس بر عملکرد اندام هوایی، غلظت روی و فسفر و میزان جذب فسفر توسط گیاه معنی‌دار شد. اثرات متقابل گوگرد با باکتری تیوباسیلوس و برادی ریزوبیوم نیز بر وزن دانه گیاه، وزن غده‌ها و غلظت آهن، فسفر و روی در گیاه معنی‌دار شد. مصرف گوگرد نیز وزن دانه، گره، اندام هوایی و عملکرد بیولوژیکی و همچنین غلظت و میزان جذب آهن، روی و فسفر گیاه را به طور معنی‌داری افزایش داد. به طور کلی اثرات مثبت ناشی از کاربرد باکتری‌های تیوباسیلوس بواسطه اکسایش گوگرد و

نظر غلظت و مقدار جذب فسفر ایجاد کند. استفاده از باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد به همراه خاک فسفات و گوگرد از نظر غلظت و مقدار جذب فسفر و استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات و اکسیدکننده‌های گوگرد به همراه خاک فسفات و گوگرد از نظر مقدار فسفر در تمام سطوح شوری اختلاف معنی‌داری را با شاهد بدون تلقیح داشتند. با توجه به اینکه استفاده زیاد از حد کودهای فسفات‌ه همواره خطر آلودگی خاک از طریق تجمع عناصری مثل کادمیم را نیز به دنبال دارد، به نظر می‌رسد استفاده از اینگونه کودها و روشهای بیولوژیک بتواند در جهت افزایش کارایی کودها و قابلیت جذب فسفر موجود در خاک و در نهایت کاهش مصرف کودهای شیمیایی مفید باشد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی مصوب دانشگاه تهران است که با استفاده از اعتبار ویژه آن اجرا شده و بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌گردد. از دیگر عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند، سپاسگزاری می‌گردد.

تولید اسید سولفوریک است که باعث آزاد شدن فسفر محلول از سنگ فسفات و افزایش قابلیت جذب دیگر عناصر می‌شوند (فانی و همکاران، 1991).

اثرات مفید متعددی از کاربرد این باکتری‌ها و گرگرد در آزمایش گلخانه‌ای و مزرعه‌ای گیاه سورگوم در خاک آهکی نیز گزارش شده است. مصرف گوگرد عملکرد، مقدار آهن، روی، منگنز و فسفر جذب شده توسط این گیاه را افزایش داد (کاپلان و اورمان، 1988). اکسایش گوگرد عنصری توسط جدایه‌هایی از جنس تیوباسیلوس در شرایط هم تلقیحی با ریزوبیوم نیز باعث تولید اسید سولفوریک، کاهش pH و بهبود گره‌بندی و عملکرد بادام زمینی شد (آناندھام و همکاران، 2007).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این آزمایش، افزایش تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، میانگین ارتفاع و تعداد برگ به ازاء نهال، جذب کل عناصر فسفر و آهن شد. استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات و اکسیدکننده‌های گوگرد به همراه خاک فسفات و گوگرد توانست بیشترین تأثیر معنی‌دار را از

جدول 4- مقایسه میانگین اثرات اصلی سطوح شوری و تیمار باکتری بر وزن تر و خشک ریشه، غلظت آهن و روی و جذب فسفر، آهن و روی

تیمار باکتری					سطح شوری			صفت
T5	T4	T3	T2	T1	S2	S1	S0	
40/42a	41/19a	44/53a	40/25a	42/10a	31/08c	41/25b	52/76a	وزن تر ریشه (g/pot)
15/38a	15/77a	16/00a	14/93a	15/77a	12/05C	15/55b	19/11a	وزن خشک ریشه (g/pot)
0/84a	0/72bc	0/84a	0/81ab	0/70c	0/82a	0/81a	0/72b	ریشه / هوایی
110/7a	113/9a	109/4a	118/0a	58/0b	87/6b	109/0a	109/4a	غلظت آهن (µg g-1)
30/9a	30/8a	30/7a	32/6a	24/6b	32/4a	31/7a	25/7b	غلظت روی (µg g-1)
22/7a	19/9b	18/5b	15/0c	12/3d	13/9c	18/5b	20/7a	جذب فسفر (mg/pot)
1424a	1267a	1473a	1445a	603b	859b	1347a	1522A	جذب آهن (µg/pot)
391a	336a	392a	384a	252b	316b	386a	350ab	جذب روی (µg/pot)

میانگین‌های مربوط به اثرات اصلی هر صفت که دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک هستند فاقد تفاوت معنی‌دار به روش آزمون دانکن در سطح 5 درصد می‌باشند

فهرست منابع:

1. امیر مکرری، ه.، و ملکوتی م. ج. 1382. نگاهی به صنعت تولید و مصرف گوگرد در ایران و نقش آن در کشاورزی، نشریه شماره 324.

17. Fernandez, L.A., P. Zalba, M.A. Gomez, and M.A. Sargardoy. 2007. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils*, 43(6): 805-809.
18. Fisher, S.E., S.I. Fisher, and S. Magris. 2007. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World J. Microbiol. Biotech.*, 23(7): 895-903.
19. Gaiad, S., and A.C. Gaur. 1991. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. *Plant and Soil*, 133: 141-149
20. Ghani, S.S., S. Rajan, and A. Lee. 1991. Enhancement of phosphate rock solubility through biological processes. *Soil Biol. Biochem.* 26(1): 127- 136 (23s).
21. Gyaneshwar, P., G.N. Kumar, L.J. Parekh & P.S. Poole. 2002. Role of microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*, 245: 83-93.
22. Han, H.S., K. Supanjani, and D. Lee. 2006. Effect of Co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil Environ*, 52(3): 130-136.
23. Hosseini-fard, S. J., and M. Mirzaei Aminiyan. 2015. Hydrochemical Characterization of Groundwater Quality for Drinking and Agricultural Purposes: A Case Study in Rafsanjan Plain, Iran. *Water Qual Expo Health.*, 7(2) : 179-185.
24. Kaplan, M., and S. Orman. 1988. Effect of elemental sulphur and sulphur containing waste in calcareous soil in Turkey. *J. of Plant Nutr.* 21(8): 1655- 1665 (26s)
25. Pathiranta, L.S.S., U.P. De, S. Waidyanatha, and O.S. Peries. 1989. The effect of apatite and elemental sulfur mixtures on growth and P content of *Centrocema pubescens*. *Fertilizer Research*, 21: 37- 43 (36s).
26. Picchioni, G.A., S. Miyamoto, and J.B. Storey. 1990. Salt effects on growth and ion uptake of pistachio rootstock seedlings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(4): 647- 653.
27. Sepaskhah, A.R., and M. Maftoun. 1988. Relative salt tolerance of pistachio cultivars. *J. of Hort. Sci.* 63(1): 157- 162.
28. Spinks, J.W.T., and S.A. Barber. 1947. Study of fertilizer uptake using radioactive phosphorus. *Sci. Agron.*, 27:145-155.
29. Stamford, N.P., R.A. Lima, C.R.S. Santos, and S. H. L. Dias. 2006. Rock Biofertilizers with *Acidithiobacillus* on Sugarcane Yield and Nutrient Uptake in a Brazilian Soil. *Geomicrobiology Journal*, 23(5): 261- 265.
30. Tenuta, M. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria: prospects for increasing nutrient acquisition and disease control. internet search (www.ms.umanitoba.ca)
31. Tilak, K.V.B.R., and B.S. Reddy. 2006. *Bacillus cereus* and *B. circulans*- novel inoculants for crops. *Current science*, 90(5): 642-644.
32. Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautial, S. Mittal, A.K. Tripathi, and B.N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current science*, 89(1): 136 – 150.
33. Tisdale, S.L., W. L. Nelson, J. D. Beaton and J. L. Havlin. 1993. *Soil Fertility and Fertilizers*. 5th ed. Mcmillon Publishing Co., New York.
34. Vidyalakshmi, R., and R. Sridar. 2007. Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria. *J. of Culture Collections*, 5: 73-77.
35. Wainwright, M. 1994. Sulfur oxidizing in soils. *Advances in Agronomy*, 37: 349- 396.
36. Yang, Z., S. Haneklaus, B. R. Singh, and E. Schnug. 2008. Effect of repeated applications of elemental sulfur on microbial pollution, sulfate concentration, and pH in soils. *Communications in soil Sci. & plant Anal.*, 39(1&2): 124-140.