Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Soil Management and Sustainable Production

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

Soil Science Society of Iran

Isolation of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria from tea rhizosphere and evaluation of their inoculum effect on soil properties and plant yield

Mohammad Alikhah[1], Nasrin Ghorbanzadeh[*2], Mohammad Bagher Farhangi[3], Maryam Khalili Rad[4], Ehsan Kahneh[5]

1. M.Sc. Graduate of Soil Science, Dept. of Soil Science, University of Guilan, Iran. E-mail: mohammad.alikhah@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Soil Science, University of Guilan, Iran. E-mail: nghorbanzadeh@guilan.ac.ir
3. Assistant Prof., Dept. of Soil Science, University of Guilan, Iran. E-mail: m.farhangi@guilan.ac.ir
4. Assistant Prof., Dept. of Soil Science, University of Guilan, Iran. E-mail: m_khalilirad@guilan.ac.ir
5. Assistant Prof., Dept. of Tea Research Center, Lahijan, Iran. E-mail: e.kahneh@areeo.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 12.14.2022
Revised: 08.13.2023
Accepted: 09.25.2023

Keywords:
Azospirillum,
Biofertilizer,
Plant growth promoting bacteria,
Rhizobacteria

ABSTRACT

Background and Objectives: Considering the high demand for tea in Iran and the insufficient local production, the use of chemical fertilizers to enhance production per unit area is increasing. The long-term use of chemical fertilizers, especially nitrogen fertilizers, in tea gardens has led to soil acidification which in turn impacted the soil quality and health. Therefore, searching for an alternative method that is as efficient as chemical fertilizers and compensates for the disadvantages caused by the excessive use of chemical fertilizers is essential in tea gardens nutrition.

Materials and Methods: In this research, native nitrogen-fixing (*Azospirillum*) and phosphorus solubilizing rhizobacteria were isolated from the rhizosphere of tea plants and then used as biofertilizers for cultivation of Chinese hybrid tea seedlings at tea research center in 1400 under pot experiment. This experiment was conducted in a randomized complete block design with factorial arrangement and three replications. The factors include pH of soil at two levels (4.65 and 5.21), and fertilizer treatments at five levels including blank (B), control; where chemical fertilizer was applied based on soil analysis (C), nitrogen fixing bacteria was applied as biofertilizer (BN), phosphorus solubilizing bacteria was applied as biofertilizer (BP), and nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria were applied as biofertilizer (BNP). After three months of tea planting, the effect of applied biofertilizers on soil biochemical characteristics and yield of tea plant were investigated.

Results: The soil pH values in all treatments that received biofertilizers were higher than that of the blank and control treatments. The highest and the lowest soil nitrogen (N) content were observed in BNP and B treatments, respectively. The highest content of soil phosphorus (P) was observed in BNP treatments, which P content in this treatment with BN was not significantly different. The soil available potassium content in treatments that receiving bio and chemical fertilizers did not show a statistically significant difference. The highest and the lowest values of fresh weight, dry weight and yield were observed in BNP and B treatments, respectively. The highest content of N and P in plant were observed in BNP (4.8%) and BP (0.24%) treatments, respectively. The potassium content of plant in treatments that received biofertilizers was lower than B,

while the potassium content in all biofertilizer treatments were higher than that of the control.

Conclusion: In this study biofertilizer treatments, *Azospirillum* and phosphorus solubilizing bacteria, increased the nitrogen and phosphorus contents in tea plant and soil, respectively. Since these bacteria improved plant growth and soil properties, it seems that native rhizobacteria isolated from tea rhizosphere have the potential to be used as biofertilizers in tea gardens in line with sustainable agriculture. Although, long term investigation during the several growth periods and different seasons of the year is needed for further evaluations.

Cite this article: Alikhah, Mohammad, Ghorbanzadeh, Nasrin, Farhangi, Mohammad Bagher, Khalili Rad, Maryam, Kahneh, Ehsan. 2024. Isolation of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria from tea rhizosphere and evaluation of their inoculum effect on soil properties and plant yield. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 13 (4), 53-73.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJSMS.2024.20881.2085
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
شاپا چاپی: ۱۲۶۷-۲۳۲۲
شاپا آنلاین: ۱۲۷۵-۲۳۲۲
انجمن علوم خاک ایران

جداسازی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و حل‌کننده فسفر از ریزوسفر چای و تأثیر مایه تلقیح آن‌ها بر ویژگی‌های خاک و رشد گیاه

محمد علیخواه[۱]، نسرین قربان‌زاده*[۲]، محمد باقر فرهنگی[۳]، مریم خلیلی راد[٤]، احسان کهنه[٥]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم خاک، گروه علوم خاک، دانشگاه گیلان، ایران. رایانامه: mohammad.alikhah@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه گیلان، ایران. رایانامه: nghorbanzadeh@guilan.ac.ir
۳. استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه گیلان، ایران. رایانامه: m.farhangi@guilan.ac.ir
٤. استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه گیلان، ایران. رایانامه: m_khalilirad@guilan.ac.ir
٥. استادیار پژوهشکده چای کشور، لاهیجان، ایران. رایانامه: e.kahneh@areeo.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۹/۲۳
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۰۵/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۷/۰۳

واژه‌های کلیدی:
آزوسپیریلیوم،
باکتری‌های محرک رشد گیاه،
ریزوباکتری،
کود زیستی

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به نیاز بالای کشور ایران به چای و کافی نبودن مقدار تولید داخلی، استفاده از کودهای شیمیایی جهت افزایش تولید در واحد سطح رو به افزایش است. کاربرد طولانی‌مدت کودهای شیمیایی به ویژه کودهای نیتروژن‌دار، سبب اسیدی شدن خاک باغ‌های چای شده و سلامت و کیفیت خاک را تحت‌تأثیر قرار داده است. از این‌رو، جست‌وجو برای یک روش جایگزین و کارآمد که کارایی آن به اندازه کودهای شیمیایی باشد و ضررهای ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی را جبران نماید، ضروری است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ابتدا ریزوباکتری‌های بومی تثبیت‌کننده نیتروژن (*آزوسپیریلیوم*) و حل‌کننده فسفر از ریزوسفر گیاه چای جداسازی و سپس به عنوان کود زیستی در کشت گلدانی نهال‌های چای هیبرید چینی در پژوهشکده چای کشور در سال ۱٤۰۰ مورد استفاده قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل pH خاک در دو سطح (٤/٦٥ و ۵/۲۱) و تیمارهای کودی در پنج سطح شامل شاهد منفی (B)، کود شیمیایی بر اساس آزمون خاک (C)، کود زیستی باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن (BN)، کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر (BP) و کود زیستی دارای باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و حل‌کننده فسفر (BNP) بودند. پس از گذشت سه ماه از کشت نهال چای در گلدان‌ها پیامد استفاده از این کودهای زیستی بر ویژگی‌های خاک و رشد گیاه چای مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مقدار pH خاک در تمامی تیمارهایی که کود زیستی دریافت نمودند نسبت به تیمارهای شاهد و کود شیمیایی بیش‌تر بود. بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار نیتروژن خاک به ترتیب در تیمارهای BNP و B مشاهده شد. بیش‌ترین مقدار فسفر فراهم خاک در تیمار BNP مشاهده شد که البته اختلاف معنی‌داری با تیمار و BN نداشت. مقدار پتاسیم قابل جذب خاک در تیمارهای دریافت‌کننده کود زیستی و شیمیایی اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد. بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار وزن تر، وزن خشک و محصول به ترتیب در تیمارهای BNP و B مشاهده شد. بیش‌ترین محتوای نیتروژن و فسفر گیاه به ترتیب مربوط به تیمارهای BNP (٤/٨ درصد) و BP (٠/٢٤ درصد) بود. محتوای پتاسیم گیاه در تیمارهای کود زیستی بیش‌تر از تیمار شاهد بود، اگرچه درصد پتاسیم در تمامی تیمارهای کود زیستی از تیمار کود شیمیایی کم‌تر بود.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش، تیمار کودهای زیستی باکتری *آزوسپیریلیوم* و حل‌کننده فسفر به‌ترتیب سبب افزایش محتوای نیتروژن و فسفر گیاه چای و خاک زیرکشت آن شدند و کاربرد هم‌زمان آن‌ها سبب افزایش کارایی هردو شد. بنابراین، از آن‌جا که این باکتری‌ها سبب بهبود رشد گیاه و ویژگی‌های خاک شدند به نظر می‌رسد رایزوباکترهای بومی جداشده از ریزوسفر چای پتانسیل استفاده در باغ‌های چای به عنوان کود زیستی را در راستای کشاورزی پایدار داشته باشند. اگرچه بررسی طولانی‌مدت در شرایط مزرعه طی چند دوره رشد و هم‌چنین فصول مختلف سال برای ارزیابی‌های بیش‌تر مورد نیاز است.

استناد: علیخواه، محمد، قربان‌زاده، نسرین، فرهنگی، محمد باقر، خلیلی راد، مریم، کهنه، احسان (۱۴۰۲). جداسازی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و حل‌کننده فسفر از ریزوسفر چای و تأثیر مایه تلقیح آن‌ها بر ویژگی‌های خاک و رشد گیاه. *نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار*، ۱۳ (۴)، ۷۳-۵۳.

DOI: 10.22069/EJSMS.2024.20881.2085

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

چای (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) گیاهی درختچه‌ای، چند ساله و همیشه سبز است که در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در سراسر جهان کشت می‌شود (۱) در مقیاس جهانی، چای تقریباً ٤/١ میلیون هکتار از اراضی جهان را با تولید سالانه برابر ۰/٦١ میلیون تن چای خشک دربرمی‌گیرد و برآورد می‌شود که به‌دلیل مزایای اقتصادی بالا، سطح زیرکشت آن در آینده افزایش پیدا کند. از این مقدار تولید، حدود ۸۰ درصد به قاره آسیا اختصاص دارد که چین از نظر سطح زیر کشت دارای مقام اول می‌باشد (۲). بر اساس آمارهای پژوهشکده چای کشور در سال ۱۳۹۵، سطح زیرکشت چای در ایران حدود ۲۷۰۰۰ هکتار است که این اراضی از منطقه کلار آباد در غرب مازندران تا فومنات در غرب استان گیلان در حاشیه جنوبی دریای خزر واقع شده‌اند.

با این حال، بهره‌وری گیاه چای در سال‌های اخیر کاهش یافته است که از جمله دلایل آن می‌توان به کمبود عناصر غذایی و تنش‌های غیرزیستی اشاره کرد. هم‌چنین برداشت اندام هوایی جدید به صورت سالانه نیز کمبود عناصر غذایی در خاک را تشدید می‌نماید (۳). به منظور برطرف کردن این مشکلات از کودهای شیمیایی بیش‌تری استفاده می‌شود که سبب عدم تعادل تغذیه‌ای و آلودگی خاک شده و در نهایت بر عملکرد باغ‌های چای نیز تأثیر منفی می‌گذارد (٤). بنابراین، برای کاهش استفاده از کودهای شیمیایی نیاز به رویکردهای جایگزین سازگار با محیط‌زیست می‌باشد.

ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه[1] (PGPR) به‌عنوان یکی از امیدوارکننده‌ترین ریزجانداران خاک برای افزایش سلامت و سرعت رشد گیاه بدون آلودگی محیطی در نظر گرفته می‌شوند و به طور قابل‌توجهی به کشاورزی پایدار کمک می‌کنند (۵). این باکتری‌ها با محیط زیست سازگارتر هستند و می‌توانند به عنوان جایگزینی ایده‌آل برای کودهای شیمیایی در نظر گرفته شوند (٦). از طرفی اسیدیته خاک یکی از جدی‌ترین مسائل مربوط به تخریب اراضی به شمار می‌رود که تقریباً نیمی از خاک‌های قابل کشت جهان را تحت‌تأثیر قرار داده است. علاوه‌بر فاکتورهای اقلیمی مانند بارندگی و آبشویی، مواد مادری اسیدی و کاربرد طولانی‌مدت عناصر غذایی معدنی اسیدزا به‌منظور جایگزینی ذخایر غذایی موجود در خاک یکی دیگر از محرک‌های اصلی اسیدی شدن خاک محسوب می‌شوند (۷ و ۸). با توجه به این‌که گیاه چای در خاک‌های اسیدی که عموماً در مقدار نیتروژن و فسفر فراهم فقیر هستند رشد می‌کند، در چنین خاک‌هایی می‌توان در دسترس بودن عناصر غذایی برای آن را با افزودن PGPR افزایش داد (۹).

کودهای دارای نیتروژن به منظور بهبود عملکرد و کیفیت گیاه چای استفاده می‌شوند که مقدار مصرف آن‌ها معمولا بسیار بیش‌تر از مقدار توصیه شده است (۱۰). علاوه بر این، گیاه چای جذب آمونیوم را برای رشد ترجیح می‌دهد که این پدیده خود سبب اسیدی شدن بیش‌تر خاک ریزوسفر می‌شود. در ریزوسفر گیاه چای، منابع میکروبی فراوانی شناسایی شده است که این میکروفلور بومی مرتبط با خاک ریزوسفری گیاه چای نه تنها می‌تواند مصرف کودهای شیمیایی را کاهش دهد، بلکه برای سلامتی خاک و گیاه نیز مفید است (۱۱). در این میان، باکتری‌های تثبیت‌کننده غیرهمزیست نیتروژن[2] مانند *Azotobacter* و *Azospirillum* برای محصولاتی مانند چای مناسب می‌باشند (۱۲). دوتا و تاکور (۲۰۱۷) طی پژوهشی بیان کردند که جدایه‌های PGPR کارآمد ارزیابی شده شامل *Pseudomonas* sp.، *Azotobacter* sp.، *Azospirillum* sp. در شرایط

1- Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

2- Asymbiotic

گلخانه دارای پتانسیل تجاری‌سازی به‌عنوان کود زیستی می‌باشند و کاربرد آن‌ها می‌تواند سبب کاهش قابل‌توجهی در استفاده از کودهای شیمیایی در مناطق چای‌کاری شود (۱۳). تأثیر باکتری *Bacillus megaterium* TRS-4 که از ریزوسفر چای جداسازی شده بود بر رشد پنج واریته چای در شرایط گلدانی و مزرعه مورد آزمایش قرار گرفت. افزایش در ارتفاع، ظاهر شدن برگ‌ها و شاخه‌های جدید و افزایش در تعداد برگ و هم‌چنین افزایش در وزن خشک برگ به دنبال کاربرد این باکتری مشاهده شد. کاربرد این باکتری حل‌کننده فسفات، سبب کاهش مقدار فسفر خاک و افزایش فسفر برگ و ریشه و فعالیت فسفاتاز در خاک شد و محتوای کلروفیل برگ‌ها نیز افزایش یافت (١٤). نپولن و همکاران (۲۰۱۲) نیز رشد و عملکرد بیش‌تری را در گیاهان چای به دلیل تلقیح هم‌زمان *Azospirillum* بومی و باکتری‌های حل‌کننده فسفات نسبت به تیمارهای تلقیح‌نشده مشاهده کردند (۱۵). تناکن و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که تقریباً ۳۳ و ۵۰ درصد کاهش در مصرف کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار و فسفردار با استفاده از تلقیح سویه‌های بومی خاک *Azospirillum* sp. + *Bacillus cereus* در شرایط مزرعه امکان‌پذیر شد (١٦).

با توجه به نیاز بالای کشور به چای و کافی نبودن میزان تولید داخلی و هم‌چنین دشوار و پرهزینه شدن واردات چای، کشاورزان به‌سمت روش‌های افزایش تولید در واحد سطح با استفاده از کودهای شیمیایی ترغیب شده‌اند که مشکل تخریب خاک را در پی دارد و در راستای مدیریت پایدار منابع خاک و آب نیست. از این‌رو، جست‌وجو برای یک روش جایگزین و کارآمد که در راستای پایداری خاک باشد، ضروری به‌نظر می‌رسد. اگرچه، گزارش هایی در مورد PGPRهای مرتبط با خاک ریزوسفر چای وجود دارد با این حال، هنوز به پژوهش‌های بیش‌تری در این زمینه با هدف ارتقای رشد و پایداری کشت چای در مناطق چایکاری نیاز است.

بنابراین با توجه به اهمیت محصول چای در استان گیلان و نیاز به کاربرد صحیح کودها در باغات چای، در این پژوهش ابتدا باکتری‌های بومی همیار تثبیت‌کننده نیتروژن (*Azospirillum*) و حل‌کننده فسفر از ریزوسفر گیاه چای جداسازی و سپس به‌عنوان کود زیستی مورد استفاده قرار گرفت. سپس پیامد استفاده از این کودهای زیستی بر ویژگی‌های خاک و رشد گیاه چای بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک: در سال زراعی ۱٤۰۱-۱٤۰۰ نمونه‌برداری خاک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر دو باغ چای دارای pH های متفاوت (عرض جغرافیایی ۳۷,۲۲,۳۷۷۱۳ و طول جغرافیایی ٤۹,۹۵۱۵۳۷۵ و عرض جغرافیایی ۳۷,۲۲۳٦۷۸۹ و طول جغرافیایی ٤۹,۹٤۸٤۰٤۷) واقع در روستای بازکیاگوراب لاهیجان انجام شد. نمونه‌های خاک پس از انتقال به آزمایشگاه هوا خشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند و سپس برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک شامل بافت (۱۷)، pH و قابلیت هدایت الکتریکی (۱۸) در سوسپانسیون ۱:۲ خاک به آب، کربن آلی (۱۹) و مقادیر نیتروژن کل و پتاسیم فراهم (۲۰) و فسفر فراهم (۲۱) اندازه‌گیری شد.

جداسازی باکتری‌ها از خاک ریزوسفری: به‌منظور جداسازی باکتری‌های ثبیت‌کننده نیتروژن (*Azospirillum*) و حل‌کننده فسفر بومی از خاک ریزوسفری باغات چای مذکور نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های خاک از عمق ۵ تا ۳۰ سانتی‌متر به همراه ریشه گیاه چای جمع‌آوری شدند. به این منظور پس از انتخاب چند بوته گیاه چای بالغ، ریشه‌های گیاه بریده شد و ریشه

و خاک چسبیده به آن جمع‌آوری شد. به منظور جداسازی خاک ریزوسفری ریشه‌ها تکان داده شدند تا خاک اضافی چسبیده به آن‌ها جدا شود. برای جداسازی باکتری‌ها از خاک چسبیده به ریشه‌ها که با تکان دادن جدا نشد و در فاصله چند میلی‌متری سطح ریشه‌ها قرار داشت، استفاده شد. نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از بوته‌های چای مخلوط شدند تا یک نمونه مرکب ساخته شود. نمونه‌های خاک ریزوسفری برداشت‌شده در دمای ٤ درجه سلسیوس به آزمایشگاه بیولوژی خاک منتقل و تا زمان جداسازی باکتری‌ها در یخچال نگهداری شدند.

به منظور جداسازی باکتری *آزوسپریلیوم*، محیط کشت نیمه جامد LGI با pH ٦ با ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک مایه‌زنی و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوباسیون شد. پس از رشد باکتری در لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت نیمه جامد LGI، لوله‌هایی که در عمق ۱ تا ۵ میلی‌متری از سطح محیط کشت پس از ۵-۳ روز دارای یک پرده یا هاله شفاف بودند، برای ادامه آزمایش انتخاب و در محیط کشت آگاردار همانند محیط کشت LGI به گونه خطی کشت داده شدند. کلونی‌های کوچک، سفید و خمیده پس از ۵ روز ظاهر و جهت ادامه آزمایش انتخاب شدند

به منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری حل‌کننده فسفر از نمونه‌های خاک ریزوسفری، سری رقت تهیه شد و در محیط کشت نوترینت آگار[1] (NA) دارای نیستاتین[2] ($50\ mg\ L^{-1}$) مایه‌زنی انجام و پتری‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس انکوباسیون شد. سپس از برخی از کلونی‌های ظاهر شده کشت خطی انجام شد و پس از خالص‌سازی و تکثیر باکتری، کشت آن‌ها در محیط کشت اسپربر[3] جامد در پتری‌دیش انجام شد. سوسپانسیون برخی از کلونی‌های انتخاب شده به طور جداگانه در آب تهیه شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از آن‌ها با روش قطره‌گذاری در محیط جامد اسپربر کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوباسیون شدند. قطر ناحیه شفاف (هاله) احاطه شده اطراف کلونی‌ها و هم‌چنین قطر کلونی بعد از زمان‌های ۲، ٤ و ۷ روز، در سه تکرار اندازه‌گیری شد. نهایتاً شاخص انحلال فسفر[4] (PSI) از طریق میانگین نسبت قطر هاله (mm) به قطر کلونی (mm) در روز هفتم محاسبه و آن باکتری که دارای بالاترین نسبت PSI بود برای ادامه آزمایش انتخاب شد (۲۲).

جهت بررسی توان حل‌کنندگی فسفر، باکتری انتخاب شده به محیط‌های مایع دارای منبع نامحلول فسفات شامل محیط کشت اسپربر، NBRIP[5] و SMM[6] مایه‌زنی شد. محیط‌ها یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور-شیکر (۱۲۰ rpm) قرار داده شدند. سپس دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی برداشت و سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه) و غلظت فسفر در محلول رویی به روش رنگ‌سنجی وانادومولیبدات با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (۲۳).

هر دو سویه انتخاب‌شده در محیط نوترینت براث[7] (NB) تکثیر شدند و برای اعمال تیمار آماده شدند.

اعمال تیمارها و کشت گلدانی: این پژوهش با پنج تیمار و سه تکرار در دو خاک با pH متفاوت (٤/٦٥ و ۵/۲۱) انجام شد. تیمارها شامل شاهد منفی (بدون اعمال تیمار کود شیمیایی و زیستی- B)، شاهد مثبت کوددهی بر اساس توصیه کودی بخش تحقیقات خاک و آب پژوهشکده چای کشور شامل افزایش ۰/۱۸ گرم

1- Nutrient Agar
2- Nystatin
3- Sperber

4- Phosphorus solubilizing index
5- National Botanical Research Institutes Phosphate Growth Medium
6- Synthetic Minimal Medium
7- Nutrient Broth

کود اوره و ۰/۰۵ گرم کود سولفات پتاسیم در گلدان (C)، کود زیستی باکتری *Azospirillum* (BN)، کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر (BP) و تیمار مصرف هم‌زمان دو کود زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر (BNP) که به خاک گلدان‌ها تلقیح شدند، بود. نهال‌های چای هیبرید چینی از پژوهشکده چای کشور در گلدان‌های کوچک دو کیلوگرمی تهیه و در زمستان سال ۱٤۰۰ پس از اعمال تیمارها به خاک گلدان‌ها، اقدام به کشت نهال‌ها گردید.

به منظور اعمال تیمارهای دارای کود زیستی پس از کشت انبوه باکتری‌ها روی محیط کشت (NB) و تهیه مایه تلقیح، نمونه‌های خاک با باکتری‌ها مایه‌زنی شدند. به این منظور ۲ کیلوگرم خاک در یک سینی ریخته شد و غلظت مشخصی (10^8 سلول در هر گرم خاک درون گلدان) از مایه تلقیح حاوی باکتری *Azospirillum* و حل‌کننده فسفر بومی جدا شده به خاک‌ها مایه‌زنی شد (۱٦). پس از مایه‌زنی خاک‌ها، تعداد چهار تا پنج عدد نهال ریشه‌دار سه ساله در گلدان‌ها کشت و گلدان‌ها در گلخانه در دمای حدود ۲۷ درجه سلسیوس و در رطوبت حدود ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه به مدت ۳ ماه نگهداری شدند. پس از کاشت نهال‌ها در گلدان‌ها تا زمان اطمینان کامل از تثبیت نهال‌ها در گلدان، مراقبت‌های معمول گلخانه‌ای مانند آبیاری با سیستم مه‌پاشی، وجین علف‌های هرز براساس توصیه بخش تحقیقات خاک و آب پژوهشکده چای کشور انجام شد.

آنالیز خاک و گیاه پس از برداشت: پس از گذشت سه ماه از کاشت نهال چای در گلدان‌ها به منظور بررسی اثر تیمارها، آنالیزهای مربوط به خاک و گیاه انجام شد. وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه اندازه‌گیری و تعداد جوانه انتهایی و برگ اول و دوم نیز شمارش شد. برگ‌های بالایی اندام هوایی هر بوته چای از گلدان‌های آزمایشی نمونه‌برداری و پس از شستشو، در دمای ۸۰ درجه سلسیوس آون خشک و آسیاب شدند. نیتروژن کل نمونه‌های گیاهی پس از هضم (۲٤) توسط دستگاه کجلدال (۲۵)، مقدار فسفر به‌وسیله روش رنگ‌سنجی وانادومولیبدات (۲٦) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و مقدار پتاسیم توسط فلیم‌فتومتر تعیین شد (۲۷). نمونه‌های خاک از هر گلدان نمونه‌برداری و پس از انتقال به آزمایشگاه و هوا خشک شدن از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند و مقدار فسفر فراهم (۲۱)، نیتروژن کل و پتاسیم فراهم (۲۰)، pH (۱۸)، تنفس پایه میکروبی (۲۸) و کربن زیست توده میکروبی (۲۹) نیز اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل و در سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل pH خاک در دو سطح (٤/٦۵ و ۵/۲۱)، و تیمارهای کودی در پنج سطح شامل شاهد منفی، شاهد مثبت، کود زیستی آزوسپریلیوم، کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر و کود زیستی حاوی *Azosprillum* و باکتری حل‌کننده فسفر بودند. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر با نرم‌افزار SAS 9.4 تحلیل شد و مقایسه میانگین داده‌های نیز با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار LSD در سطح ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های باکتری‌های جدا شده: بررسی برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک باکتری *آزوسپریلیوم* جداشده نشان داد که باکتری گرم- منفی، بدون توان تولید اسپور، کاتالاز- مثبت با رشد بهینه در شرایط کم‌هوازی، متحرک با تاژک قطبی و به صورت باسیل‌های کشیده با طول و عرض ۱ در ۱/۵ تا ٤ میکرومتر با پیچش مختصر در محور اصلی بود. گرانول‌های PHB[1] در درون یاخته قابل مشاهده بود.

1- Polyhydroxybutyrate

باکتری در دامنه دمایی ۷ تا ۳۷ درجه سلسیوس (با دمای بهینه ۳۰) توانایی رشد داشت. pH رشد آن نیز از ۵/۵ تا ۷ متغیر بود. بررسی برخی ویژگی‌های باکتری حل‌کننده فسفر انتخاب شده نشان داد که باکتری گرم- مثبت، با توان تولید اسپور، کاتالاز- مثبت (هوازی)، متحرک و به صورت باسیل با طول و عرض ۱ در ۱/۵ میکرومتر بود. باکتری در دامنه دمایی ۷ تا ۳۰ درجه سلسیوس (با دمای بهینه ۲۵) توانایی رشد داشت. pH رشد آن نیز از ٦/۵ تا ۷/۵ متغیر بود. توان حل‌کنندگی فسفر توسط باکتری انتخاب شده در محیط‌های کشت اسپربر، NBRIP و SMM به‌ترتیب ۵۷/٤، ۸۲/۵ و ۷۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک: برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. با توجه به pH، خاک‌های ۱ و ۲ به ترتیب در بازه خاک‌ها اسیدی بسیار شدید (۵-٤/۵) و اسیدی شدید (۵/۵-۵/۱) قرار می‌گیرند (۳۰). هم‌چنین هر دو خاک دارای بافت لوم رسی و کربن آلی بالایی هستند.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها.

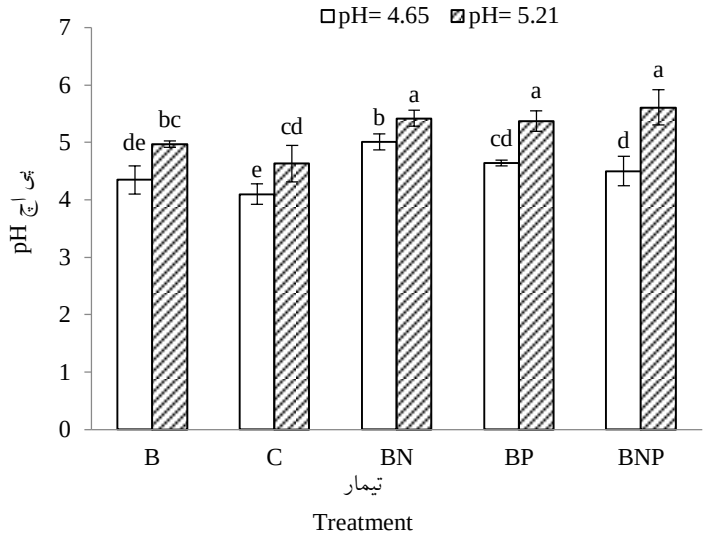
Table 1. Physicochemical properties of the soils.

رس Clay	سیلت Silt	شن Sand	پتاسیم فراهم Available potassium	فسفر فراهم Available phosphorus	نیتروژن کل Total nitrogen	کربن آلی Organic carbon	قابلیت هدایت الکتریکی Electrical conductivity	پی‌اچ pH	ویژگی‌ها Characteristics
g $100g^{-1}$			mg kg^{-1}		g $100g^{-1}$		dS m^{-1}		
34.8	24.6	40.6	229.5	73.3	0.31	2.97	0.9	4.65	خاک ۱ Soil 1
30.8	26.6	42.6	211.8	78.3	0.28	2.81	0.78	5.21	خاک ۲ Soil 2

تأثیر تیمارها بر ویژگی‌های خاک

pH خاک: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر pH خاک معنی‌دار است ($P\leq$۰/۰۱). در شکل ۱ اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر pH خاک نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است مقدار pH در تیمار شاهد و کود شیمیایی در هر دو خاک پس از کاشت گیاه نسبت به pH اولیه خاک‌ها (جدول ۱) کاهش یافت. اما در تیمارهای کود زیستی افزایش مقدار pH نسبت به خاک‌های اولیه مشاهده شد. هم‌چنین در تمام تیمارهایی که کود زیستی دریافت کردند، مقدار pH نسبت به تیمار شاهد و کود شیمیایی بیش‌تر بود. وو و همکاران (۲۰۱۸) پس از افزودن باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* به‌عنوان یک باکتری PGPR به خاک مشاهده کردند که علاوه بر افزایش رشد گیاه و بالا رفتن مقدار کل نیتروژن در گیاه، مقدار pH خاک نیز افزایش می‌یابد. افزایش pH در تیمارهای کود زیستی به‌ویژه تیمارهای دارای آزوسپریلیوم می‌تواند به دلیل رهاسازی آهسته آمونیوم در محیط خاک به دنبال تثبیت زیستی نیتروژن باشد (۳۱). این در حالی است که در تیمار کود شیمیایی اوره، نیتروژن آلی به یک‌باره وارد خاک می‌شود و به سرعت توسط جامعه میکروبی هتروتروف خاک تجزیه و سپس آمونیوم آزاد شده توسط باکتری‌های کمولیتوتروف اکسیدکننده آمونیوم تبدیل به نیترات می‌شود که این فرایند کاهش pH خاک را به دنبال دارد (۳۲). همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، در تیمار BP در هر دو خاک و BNP در خاک ۱ که

دریافت‌کننده کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر بودند، pH نسبت به تیمار BN کم‌تر بود. مقایسه تیمارهای BP و BN به‌خوبی تأثیر باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن در افزایش pH خاک را نشان می‌دهد اما به‌نظر می‌رسد تأثیر حضور هم‌زمان دو باکتری بر pH به نوع خاک وابسته باشد. به‌طورکلی اسیدهای آلی تولید شده ناشی از فعالیت باکتری‌های حل‌کننده فسفر، pH محیط را کاهش داده و به حل‌شدن فسفر کمک بیش‌تری می‌کنند (۳۳). نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نیز بیانگر تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفر بر روی pH خاک است، هر چند که این تأثیرات قابل‌توجه نیست. این امر می‌تواند تحت‌تأثیر pH اولیه خاک‌ها نیز قرار گیرد و به نظر می‌رسد در خاکی که pH اولیه آن کم‌تر بوده تأثیر باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن روشن‌تر است. علاوه بر این، با توجه به این‌که خاک‌های مورد مطالعه، ظرفیت بافری بالایی در برابر تغییرات pH دارد که با توجه به درصد رس و مواد آلی خاک‌ها قابل توجیه است (جدول ۱)، در نتیجه تا زمانی‌که تمام یون‌های اسیدی سطح کلوئیدهای خاک خنثی نشوند، تغییر محسوسی در مقدار pH خاک مشاهده نخواهد شد.



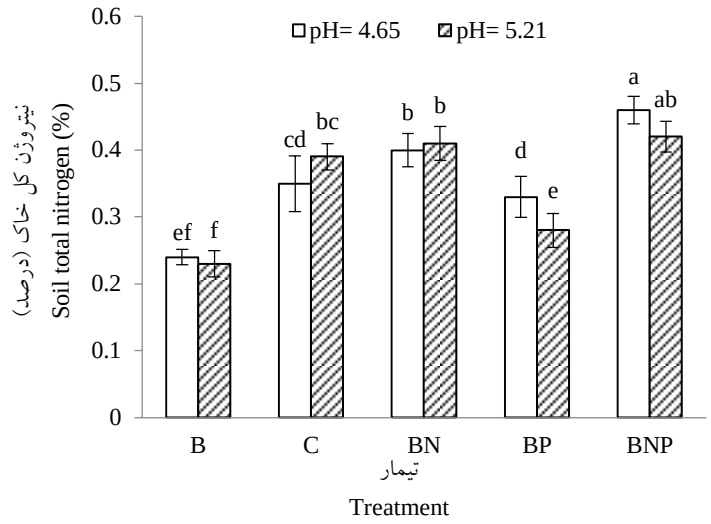
شکل ۱- اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر pH خاک.

B: شاهد، C: کود شیمیایی، BN: کود زیستی *Azospirillum*، BP: کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر، BNP: کاربرد هم‌زمان کود زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر. حروف یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد است. Error bars روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

Figure 1. The effect of soil interaction and fertilizer treatments on soil pH.
B: control, C: chemical fertilizer, BN: biofertilizer of *Azospirillum*, BP: biofertilizer of phosphorus solubilizing bacteria, BNP: Simultaneous application of biological fertilizer *Azospirillum* and phosphorus solubilizing bacteria. Same letters on the columns indicate not significant difference (P<0.05). Different fractions of phosphorus in different soils have been analyzed separately.

نیتروژن کل خاک: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر مقدار نیتروژن کل خاک معنی‌دار است (P≤۰/۰۱). کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار نیتروژن به ترتیب در خاک شماره ۱ در تیمار B و BNP مشاهده شد (شکل ۲). در خاک شماره ۲ مقدار نیتروژن در تیمار B کم‌ترین مقدار را

نشان داد و بیش‌ترین مقدار نیتروژن در تیمارهای BNP و BN مشاهده شد که اختلاف آماری معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند. گزارش شده است که وجود منابع کربن و اکسیژن کافی در اطراف ریشه و نقاطی که باکتری *Azosprillum* فعالیت دارد، سبب افزایش مقدار تثبیت شده می‌شود (۳٤) که با نتایج پژوهش حاضر در رابطه با تیمارهای دریافت کننده کود زیستی باکتری *Azosprillum* هم‌راستا است. نئوپلین و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که کودهای زیستی حاوی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و فسفر، موجب افزایش این عناصر غذایی و در نتیجه بهبود باروری خاک باغ‌های چای و به دنبال آن کاهش مصرف کودهای شیمیایی می‌شوند (۱۵). با توجه به استفاده از کود اوره به‌منظور جبران کمبود نیتروژن در خاک‌های مورد آزمایش، افزایش معنی‌دار درصد نیتروژن در تیمار کود شیمیایی، طبیعی به‌نظر می‌رسد. هم‌چنین افزایش معنی‌دار درصد نیتروژن در تیمار BNP می‌تواند ناشی از فعالیت باکتری حل‌کننده فسفر و تأثیر مثبت آن روی فعالیت باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن باشد. بنابراین با توجه به روابط متقابل بین دو باکتری حل‌کننده فسفر و تثبیت‌کننده نیتروژن می‌توان در ارتباط با مقدار نیتروژن، به‌منظور جبران کمبود نیتروژن خاک و هم‌چنین جلوگیری از خطرات زیست‌محیطی ناشی از مصرف کودهای شیمیایی، استفاده تلفیقی از این دو باکتری را توصیه نمود.

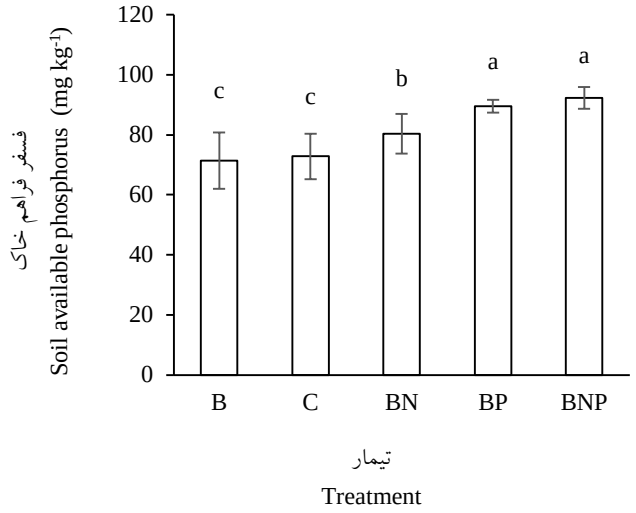


شکل ۲- اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر مقدار نیتروژن کل خاک.

B: شاهد، C: کود شیمیایی، BN: کود زیستی *Azospirillum*، BP: کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر، BNP: کاربرد هم‌زمان کود زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر. حروف یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد است. Error bars روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

Figure 2. The effect of soil interaction and fertilizer treatments on soil total nitrogen.
B: control, C: chemical fertilizer, BN: biofertilizer of *Azospirillum*, BP: biofertilizer of phosphorus solubilizing bacteria, BNP: Simultaneous application of biological fertilizer *Azospirillum* and phosphorus solubilizing bacteria. Same letters on the columns indicate not significant difference (P<0.05). Different fractions of phosphorus in different soils have been analyzed separately.

فسفر فراهم خاک: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمارهای کودی بر مقدار فسفر خاک معنی‌دار بود (P≤۰/۰۱). اما برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر فسفر فراهم خاک معنی‌دار نبود که با توجه به نتایج آزمون خاک و کافی بودن فسفر فراهم (جدول ۱)، معنی‌دار نشدن آن در بخش اثر متقابل تیمارها، قابل پیش‌بینی بود. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود دو تیمار BNP و BN بیش‌ترین مقدار فسفر فراهم خاک را نشان دادند که اختلاف معنی‌داری نیز بین این دو تیمار مشاهده نشد.



شکل ۳- اثر تیمارهای کودی بر مقدار فسفر فراهم خاک.

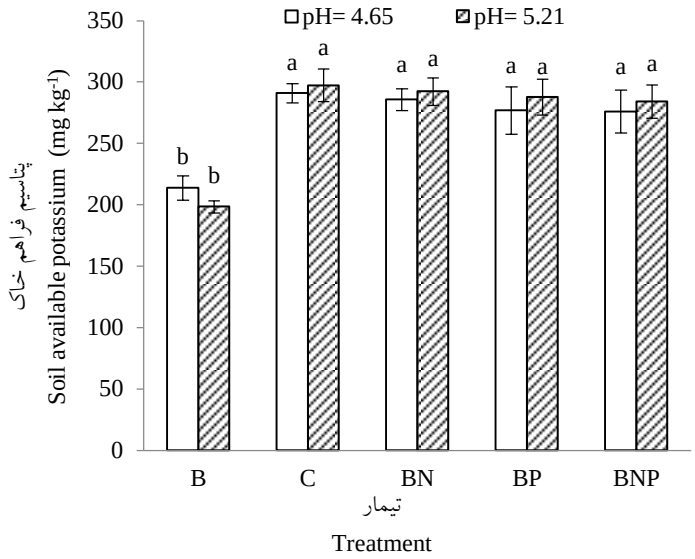
B: شاهد، C: کود شیمیایی، BN: کود زیستی *Azospirillum*، BP: کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر، BNP: کاربرد هم‌زمان کود زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر. حروف یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد است. Error bars روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

Figure 3. The effect of fertilizer treatments on the soil available phosphorus.
B: control, C: chemical fertilizer, BN: biofertilizer of *Azospirillum*, BP: biofertilizer of phosphorus solubilizing bacteria, BNP: Simultaneous application of biological fertilizer *Azospirillum* and phosphorus solubilizing bacteria. Same letters on the columns indicate not significant difference (P<0.05). Different fractions of phosphorus in different soils have been analyzed separately.

اگرچه مقدار فسفر در تیمار BN نسبت به تیمارهای دریافت‌کننده کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر کم‌تر بود اما در مقایسه با تیمار B و C بیش‌تر بود. نتایج پژوهش حاضر بیانگر نقش مؤثر کاربرد هم‌زمان کودهای زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر در جذب فسفر توسط خاک بوده و پژوهش‌های پیشین را تأیید می‌نماید. گزارش شده است که تلقیح هم‌زمان *Azospirillum lipoferum* و *Bacillus megaterium* به خاک، سبب ایجاد تعادل در فسفر و نیتروژن خاک و جذب آن توسط گیاه می‌شود (۳۵). افزایش بیش‌تر مقدار فسفر در تیمار BNP، نسبت به تیمار BP، می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن با ایجاد روابط متقابل مثبت، سبب فعالیت بیش‌تر باکتری حل‌کننده فسفر می‌شوند.

پتاسیم فراهم خاک: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر مقدار پتاسیم فراهم خاک معنی‌دار است (P≤۰/۰۱). مقدار

پتاسیم فراهم خاک در تیمارهای دریافت‌کننده کود شیمیایی و زیستی اختلاف آماری معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند. اگرچه بین تیمارهای دریافت‌کننده کود زیستی و شیمیایی اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ٤). اگرچه تمامی تیمارهای مورد بررسی، به‌جز تیمار شاهد، از لحاظ میزان اثرگذاری بر پتاسیم فراهم خاک، عملکرد تقریباً یکسانی داشتند، اما این تأثیرات در خاک شماره ۲ با pH=۵/۲۱ و پتاسیم فراهم اولیه کم‌تر (جدول ۱) محسوس‌تر بود. اگرچه در این پژوهش باکتری حل‌کننده پتاسیم استفاده نشد، با این حال نشان داده شده است که باکتری‌های *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Micrococcus* که در انحلال فسفر نامحلول خاک نقش حیاتی ایفا می‌کنند، می‌توانند در انحلال پتاسیم خاک نیز مؤثر باشند (۳۵). با توجه به جبران کمبود پتاسیم خاک با به‌کار بردن کود سولفات پتاسیم در تیمار کود شیمیایی افزایش مقدار پتاسیم خاک قابل پیش‌بینی بود، اما افزایش مقدار پتاسیم در تیمارهای BP و BNP به اندازه تیمار C جالب توجه است که بیانگر توانایی باکتری حل‌کننده فسفر در انحلال پتاسیم خاک می‌باشد. بر همین اساس می‌توان بیان نمود که در تیمار BN نیز باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن بر روی فعالیت ریزجانداران بومی حل‌کننده فسفر و پتاسیم در ریزوسفر چای، تأثیر مثبتی گذاشته است.

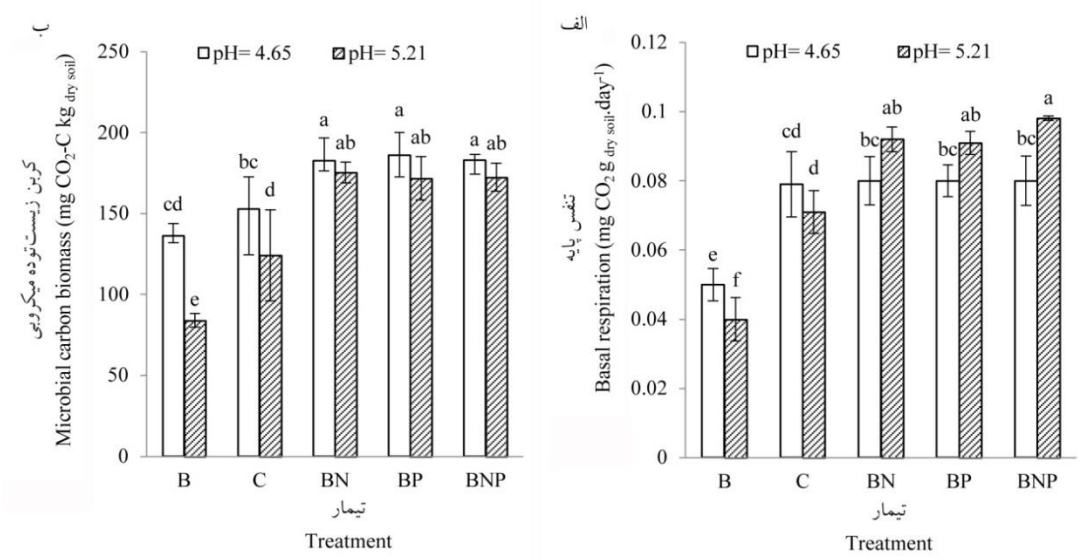


شکل ٤- اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر مقدار پتاسیم فراهم خاک.

B: شاهد، C: کود شیمیایی، BN: کود زیستی *Azospirillum*، BP: کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر، BNP: کاربرد هم‌زمان کود زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر. حروف یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد است. Error bars روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

Figure 4. The effect of soil interaction and fertilizer treatments on soil available potassium.
B: control, C: chemical fertilizer, BN: biofertilizer of *Azospirillum*, BP: biofertilizer of phosphorus solubilizing bacteria, BNP: Simultaneous application of biological fertilizer *Azospirillum* and phosphorus solubilizing bacteria. Same letters on the columns indicate not significant difference (P<0.05). Different fractions of phosphorus in different soils have been analyzed separately.

تنفس پایه میکروبی و کربن زیست‌توده میکروبی خاک: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر تنفس پایه میکروبی و کربن زیست‌توده میکروبی خاک معنی‌دار است ($P\leq$۰/۰۱). کم‌ترین مقدار تنفس میکروبی پایه در خاک شماره ۲ در تیمار B به‌دست آمد که تفاوت آماری معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (شکل ۵- الف). بیش‌ترین مقدار تنفس میکروبی هم در خاک ۲ و در تیمار BNP به‌دست آمد که تفاوت آماری معنی‌دار با تیمارهای BP و BN در این خاک نداشت. در هر دو خاک مقدار تنفس پایه میکروبی در تیمارهایی که کود دریافت کرده بودند نسبت به تیمار شاهد بیش‌تر بود، با این حال، در خاک ۱، تفاوت مقدار تنفس میکروبی در تیمارهای دریافت‌کننده کود با تیمار C معنی‌دار نبود (شکل ۵- الف). مقدار تنفس پایه میکروبی در تیمارهایی که کود زیستی دریافت کرده بودند در خاک شماره ۲ که دارای pH بالاتری می‌باشد بیش‌تر بود. ژانگ و همکاران (۲۰۲۱) نیز افزایش تنفس میکروبی در خاک شالیزار را با تلقیح *Azospirillum* و *Pseudomonas* گزارش کردند (۳٦). افزایش معنی‌دار تنفس پایه میکروبی در تیمارهای کود زیستی می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که با توجه به این‌که باکتری‌های به‌کار برده شده در این پژوهش از باکتری‌های بومی ریزوسفری گیاه چای جداسازی شده‌اند، تغییر نسبت جمعیتی این‌ها نسبت به سایر ریزجانداران ریزوسفری، تأثیر منفی (حداقل) روی فعالیت آن‌ها نداشته و حتی ممکن است اثر مثبت داشته باشد. هر چند تعیین دقیق این ادعا، نیاز به ابزارهای دقیق مولکولی و توالی‌یابی ژنتیکی دارد.



شکل ۵- اثر برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی بر مقدار تنفس پایه میکروبی (الف) و کربن زیست‌توده میکروبی (ب).

B: شاهد، C: کود شیمیایی، BN: کود زیستی *Azospirillum*، BP: کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر، BNP: کاربرد هم‌زمان کود زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر. حروف یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد است. Error bars روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

Figure 5. The effect of soil interaction and fertilizer treatments on soil basal respiration (a) and microbial carbon biomass (b).

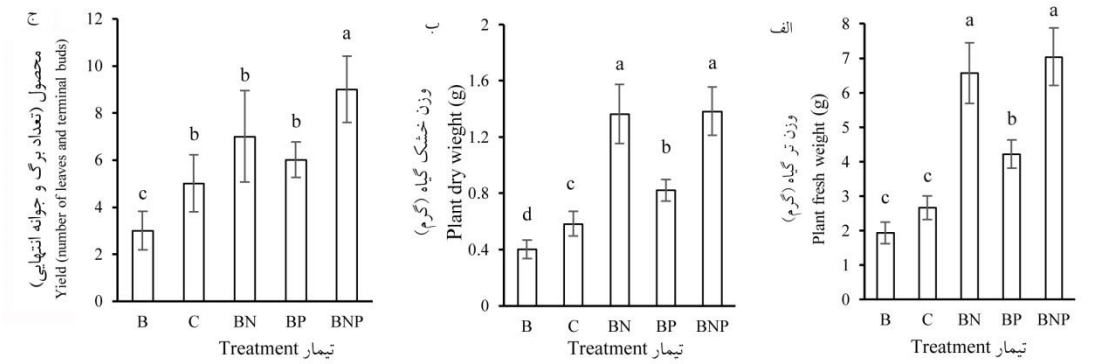
B: control, C: chemical fertilizer, BN: biofertilizer of *Azospirillum*, BP: biofertilizer of phosphorus solubilizing bacteria, BNP: Simultaneous application of biological fertilizer *Azospirillum* and phosphorus solubilizing bacteria. Same letters on the columns indicate not significant difference (P<0.05). Different fractions of phosphorus in different soils have been analyzed separately.

بیش‌ترین مقدار کربن زیست‌توده میکروبی در تیمار BP در خاک ۱ به‌دست آمد اگرچه تفاوت آن با سایر تیمارهای دارای کود زیستی در هر دو خاک معنی‌دار نبود. در همه تیمارها کربن زیست‌توده در خاک ۱ با pH پایین‌تر، بیش‌تر از خاک ۲ بود و این تفاوت در تیمار شاهد از همه بیش‌تر بود (شکل ۵- ب). به‌نظر می‌رسد کنترل‌کننده کربن زیست‌توده در این خاک‌ها قارچ‌ها باشند که در خاک‌های اسیدی فراوانی بیشتری از باکتری‌ها دارند (۳۲). به هرحال، تلقیح خاک با باکتری‌ها و هم‌چنین کوددهی سبب نزدیک شدن محتوای کربن زیست‌توده به هم، در دو خاک شده است. زیست‌توده میکروبی به سرعت و در کوتاه‌مدت به ورود کربن آلی از منابع مختلف پاسخ می‌دهد و چون اغلب خاک‌ها با محدودیت کربن روبرو هستند، بنابراین با توجه به افزایش مقدار کربن آلی در خاک‌ها به دنبال افزایش کودهای زیستی (شکل ۵- ب) مقدار کربن زیست‌توده میکروبی نیز افزایش یافته است. در و اقع پیامد مثبت تیمارهای دارای کود زیستی نسبت به سایر تیمارها می‌تواند به این دلیل باشد که هر قدر کربن آلی خاک بالا باشد شرایط مناسب‌تری برای ریزجانداران فراهم شده، آن‌ها رشد نموده و زیست‌توده میکروبی به سرعت افزایش می‌یابد. تیپ و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که استفاده از قارچ‌های تولیدکننده آنزیم‌های زایلاناز، لیگنیناز و سلولاز تجزیه‌کننده مواد آلی خاک به عنوان کود زیستی، به‌طور معنی‌داری ماده آلی را ار ۲/۱۹ تا ٤/٥٦ درصد افزایش و به دنبال آن سبب افزایش فعالیت میکروبی خاک و کربن زیست‌توده میکروبی شد (۳۷).

تأثیر تیمارها بر ویژگی‌های گیاه

وزن تر و خشک گیاه و مقدار محصول: آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمارهای کودی بر ویژگی‌های مورد بررسی گیاه معنی‌دار و برهم‌کنش خاک و تیمارهای کودی معنی‌دار نبود. اثر تیمارهای کودی بر وزن تر، خشک و مقدار محصول گیاه در شکل ٦ الف، ب و ج نشان داده شده است. کم‌ترین مقدار وزن تر در تیمار B مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار C نداشت و بیش‌ترین مقدار در تیمار BNP مشاهده شد که با تیمار BN تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ٦- الف). گزارش شده است که کودهای دارای نیتروژن سبب افزایش عملکرد گیاه چای و مقدار اسیدهای آمینه می‌شود (۳۸). پژوهشی دیگری نشان داده است که پیش‌تیمار بذرهای کلزا با سویه‌های متفاوت از باکتری *Pseudomonas* سبب افزایش شاخص‌های رشد از طریق بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی مانند مقدار آب نسبی برگ و پتانسیل آب برگ در سطوح مختلف شوری می‌شود. بر اساس یافته‌های به‌دست آمده، استفاده از باکتری‌های محرک رشد نقش قابل‌توجهی در افزایش رشد گیاهان دارد (۳۹). نتایج پژوهش حاضر نیز بیانگر تأثیر قابل‌توجه باکتری‌های محرک رشد بر وزن تر گیاه داشته و می‌تواند جهت تقویت بوته‌ی چای و هم‌چنین افزایش عملکرد آن، مورد استفاده قرار گیرد.

در راستای نتایج این پژوهش، گزارش شده است که تلقیح سویه ETR17 باکتری *Serratia marcescens* جداسازی شده از باغ‌های چای واقع در غرب بنگال نیز اثرات ارتقادهنده رشد را در گیاه چای نشان داد. به طوری‌که ۵۵ روز پس از تلقیح این باکتری به خاک، طول ساقه و ریشه به ترتیب ۲۰ تا ۳۲ درصد در مقایسه با شاهد افزایش یافت (٤۰). چاکرابورتی و همکاران (۲۰۱۳) نیز اثرات مثبت این باکتری بر رشد گیاه چای و افزایش تقریباً ۵۰ درصدی ارتفاع نهال را گزارش کردند. اگرچه بیان نمودند که گونه‌های بومی منطقه سازگاری بهتری با شرایط محیطی نشان دادند (٤۱).



شکل ٦- اثر تیمارهای کودی بر مقدار وزن تر گیاه (الف)، وزن خشک گیاه (ب) و مقدار محصول (ج).

B: شاهد، C: کود شیمیایی، BN: کود زیستی *Azospirillum*، BP: کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر، BNP: کاربرد هم‌زمان کود زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر. حروف یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد است. Error bars روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

Figure 6. The effect of fertilizer treatments on plant fresh weight (a), plant dry weight (b) and yield (c). B: control, C: chemical fertilizer, BN: biofertilizer of *Azospirillum*, BP: biofertilizer of phosphorus solubilizing bacteria, BNP: Simultaneous application of biological fertilizer *Azospirillum* and phosphorus solubilizing bacteria. Same letters on the columns indicate not significant difference (P<0.05). Different fractions of phosphorus in different soils have been analyzed separately.

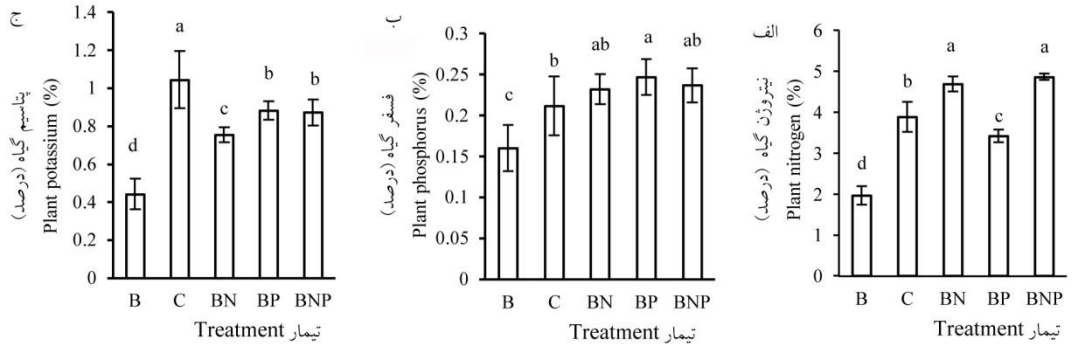
کم‌ترین مقدار وزن خشک در تیمار B مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. بیش‌ترین مقدار در تیمار BNP مشاهده شد که با تیمار BN تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ٦- ب). در یک پژوهش مشابه، کاهش ۱/۳ و ۱/۲ برابری مصرف کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار و فسفردار به‌همراه عملکرد یکسان در باغات چای با استفاده از باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن *Azospirillum* و حل‌کننده فسفر *Bacillus cereus* مشاهده شد (١٦). لیو و همکاران (۲۰۲۲) نیز گزارش کردند که تلقیح خاک با باکتری *Serratia marcescens* JW-CZ2 به مدت ۱۸۰ روز به‌طور معنی‌داری ارتفاع اندام هوایی، قطر ساقه و وزن خشک گیاه چای را به ترتیب ٥۳/٤٤، ۱۱/۳۷ و ۲۹/۳٤ درصد در مقایسه با گیاه شاهد افزایش داد که بیانگر اثرات مثبت این باکتری بر رشد گیاه چای است (٤). با توجه به تأثیر کودهای زیستی به‌ویژه باکتری‌های محرک رشد گیاه بر ویژگی‌های رشدی گیاه، استفاده از آن‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌های کاربردی در راستای مدیریت تغذیه گیاهی برای سیستم کشاورزی پیشنهاد شده است (٤۲). نتایج این پژوهش نیز تأیید می‌نماید که باکتری‌های محرک رشد به‌ویژه *Azospirillum* سبب افزایش وزن خشک گیاه می‌شود.

مقدار محصول در تیمار B کم‌ترین مقدار را داشت و تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود. در تیمار BNP نیز بیش‌ترین مقدار محصول به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. اگرچه مقدار محصول در تیمارهای BN و BP بیش‌تر از تیمار C بود ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (شکل ٦- ج) که بیانگر تأثیر بهتر کاربرد هم‌زمان باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و حل‌کننده فسفر می‌باشد. در پژوهش‌های مشابه گزارش شده است که تیمارهای زیستی از طریق تولید تنظیم‌کننده‌های رشدی مانند اکسین، سیتوکنین و جیبرلین و جلوگیری از تولید هورمون اتیلن موجب بهبود جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه شده و مقدار محصول نهایی را افزایش

می‌دهد (٤٣). هم‌چنین باکتری‌های محرک رشد از طریق بهبود عملکرد آنزیم‌ها در فرایند فتوسنتز، تنفس سلولی، افزایش تقسیم و توسعه سلولی موجب افزایش رشد گیاه و در نهایت مقدار محصول تولیدی می‌شوند (٤٤). نتایج حاصل از این پژوهش هم نشان داد که باکتری‌های محرک رشد می‌توانند کارایی مناسبی در راستای افزایش محصول تولیدی داشته باشند و نسبت به کودهای شیمیایی بهتر عمل نمایند.

نیتروژن، فسفر و پتاسیم گیاه: مقدار نیتروژن گیاه در تیمار شاهد کم‌ترین مقدار را داشت و تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود. بیش‌ترین مقدار نیتروژن گیاه در تیمار BNP مشاهده شد که با تیمار BN اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۷- الف). باردواج و همکاران نیز (٢٠١٤) گزارش کردند که تلقیح هم‌زمان *Azospirillum lipoferum* و *Bacillus megaterium* در گیاهان، سبب ایجاد تعادل در جذب فسفر و نیتروژن توسط گیاه می‌شوند (٣٥).

در همین راستا نتایج این پژوهش نیز بیانگر تأثیر مثبت باکتری‌های محرک رشد بر روی درصد نیتروژن گیاه بود. مقدار نیتروژن در تیمار BN به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار کود شیمیایی بود. با این حال کاربرد هم‌زمان باکتری حل‌کننده فسفر و تثبیت‌کننده نیتروژن (تیمار BNP) تأثیر بیش‌تری بر درصد نیتروژن گیاه داشت. مارکوس و همکاران (٢٠١٠) نیز گزارش کردند که باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن با تولید آمونیوم نقش مهمی در رشد گیاه ایفا می‌نمایند و با تجمع نیتروژن به افزایش رشد ریشه، اندام هوایی و تولید زیست‌توده کمک می‌کنند (٤٥).



شکل ۷- اثر تیمارهای کودی بر مقدار نیتروژن (الف)، فسفر (ب) و پتاسیم (ج) گیاه.

B: شاهد، C: کود شیمیایی، BN: کود زیستی *Azospirillum*، BP: کود زیستی باکتری حل‌کننده فسفر، BNP: کاربرد هم‌زمان کود زیستی *Azospirillum* و باکتری حل‌کننده فسفر. حروف یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد است. Error bars روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

Figure 7. The effect of fertilizer treatments on nitrogen (a), phosphorus (b) and potassium (c) of plant. B: control, C: chemical fertilizer, BN: biofertilizer of *Azospirillum*, BP: biofertilizer of phosphorus solubilizing bacteria, BNP: Simultaneous application of biological fertilizer *Azospirillum* and phosphorus solubilizing bacteria. Same letters on the columns indicate not significant difference (P<0.05). Different fractions of phosphorus in different soils have been analyzed separately.

درصد فسفر در تیمار BP بیش‌ترین مقدار را نشان داد که با تیمارهای BN و BNP تفاوت معنی‌داری نداشت. اگرچه بین درصد فسفر گیاه در تیمار C با BP اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۷- ب). نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر تأثیر مثبت باکتری‌های محرک رشد در مقایسه با تیمار کود

شیمیایی بر مقدار فسفر جذب شده توسط گیاه بود که علت این امر را می‌توان توانایی بالای این باکتری‌ها در تبدیل یون‌های فسفر غیرفراهم به فرم فراهم برای گیاه دانست. تأثیر مثبت کاربرد کودهای زیستی بر مقدار جذب فسفر توسط گیاه در پژوهش‌های گذشته نیز نشان داده شده است (۳۵).

بیش‌ترین درصد پتاسیم گیاه در تیمار C مشاهده شد که در مقایسه با سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود که با توجه به استفاده از کود شیمیایی سولفات پتاسیم این افزایش قابل انتظار بود. درصد پتاسیم گیاه در تیمارهای دارای کود زیستی کم‌تر از تیمار C بود، اگرچه درصد پتاسیم در تمامی تیمارهای کود زیستی بیش‌تر از تیمار شاهد بود (شکل ۷- ج). افزایش درصد پتاسیم در تیمارهای BP و BNP در مقایسه با شاهد را می‌توان به کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفر در این تیمارها نسبت داد. گزارش شده است که باکتری‌های حل‌کننده فسفر به دلیل تولید فراورده‌های اسیدی برای انحلال کانی‌های فسفاته بر حلالیت کانی‌های دارای پتاسیم نیز مؤثر بوده و سبب رهاسازی پتاسیم از آن‌ها می‌شوند که افزایش درصد پتاسیم در گیاه را به دنبال خواهد داشت (٤٦). پژوهش‌های مشابه نیز نشان داده‌اند که برخی از باکتری‌های *Pseudomonas* با تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و افزایش جذب مواد غذایی به‌طور مستقیم، سبب افزایش جذب پتاسیم در برگ شده و در نهایت رشد گیاه را افزایش می‌دهند (۳۵). با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش به نظر می‌رسد که باکتری‌های جداسازی شده از خاک ریزوسفر چای می‌توانند به عنوان کودهای زیستی در باغ‌های چای مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، توانایی ریزوباکتری‌های بومی باغ‌های چای به عنوان کود زیستی در بهبود شاخص‌های فیزیکوشیمیایی خاک و ارتقا رشد گیاه چای مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بیانگر تأثیر مثبت کاربرد کود زیستی بر ویژگی‌های شیمیایی و زیستی خاک بود. هم‌چنین تلقیح ریزوباکتری‌های بومی نه‌تنها اثر نامطلوبی بر فعالیت سایر ریزجانداران خاک نداشت، بلکه اثر مثبتی را نیز در روابط آن‌ها ایجاد کرد. اگرچه برای تعیین اثرات آن‌ها بر رشد گیاه در شرایط مزرعه به منظور بررسی اثرات متقابل طبیعی این باکتری‌ها با دیگر میکروفلور طبیعی خاک و گیاه میزبان به پژوهش‌های بیش‌تری نیاز است. در این پژوهش اثر بخشی تیمارهای دارای کود زیستی در بهبود جذب عناصر غذایی و در نتیجه افزایش محصول گیاه را می‌توان بهترین جنبه عملکرد باکتری‌های محرک رشد دانست، زیرا که هدف نهایی استفاده از تیمارهای زیستی، بهبود تغذیه گیاه و افزایش عملکرد آن در کنار کمک به حفظ جنبه‌های زیست‌محیطی است. در این راستا می‌توان تیمارهای BNP و BN را به عنوان کودهای مؤثر در باغ‌های چای پیشنهاد نمود. اگرچه بررسی طولانی‌مدت طی چند دوره رشد و طی فصول مختلف سال برای ارزیابی‌های بیش‌تر مورد نیاز است.

منابع

1. Wang, X., Han, C., Zhang, J., Huang, Q., Deng, H., Deng, Y., & Zhong, W. (2015). Long-term fertilization effects on active ammonia oxidizers in an acidic upland soil in China. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 28-37. **doi:org/10. 1016/j.soilbio.2015.02.013.**
2. International Statistical Yearbook. (2018). National Bureau of Statistics of China. China Statistics Press Available at. **doi:http://data.stats.gov.cn/files/lastestpub/gjnj/2018/zk/indexch.htm.**
3. Upadhyaya, H., & Panda, S. K. (2013). Abiotic stress responses in tea [*Camellia sinensis* L (O) Kuntze]: an overview. *Reviews in Agricultural Science,* 1, 1–10. **doi: 10.7831/ras.1.1.**
4. Liu, H., Chen, G. H., Sun, J. J., Chen, S., Fang, Y., & Ren, J. H. (2022). Isolation, characterization, and tea growth-promoting analysis of JW-CZ2, a bacterium with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity isolated from the rhizosphere soils of tea plants. *Frontiers in Microbiology*, 13, 792876. **doi: 10.3389/fmicb.2022. 792876.**
5. Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Boyce, A. N. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability. *A Review Molecules,* 21, 573.
6. Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. *Applied Soil Ecology,* 138, 10-18. **doi: 10.3390/molecules21050573.**
7. Yirga, C., Erkossa, T., & Agegnehu, G. (2019). Soil acidity management; Ethiopian Institute of Agricultural Research (EIAR): Addis Ababa, Ethiopia.
8. Hu, Z., Ji, L., Wan, Q., Li, H., Li, R., & Yang, Y. (2022). Short-term effects of bio-organic fertilizer on soil fertility and bacterial community composition in tea plantation soils. *Agronomy,* 12, 2168. **doi:10.3390/agronomy12092168.**
9. Bhattacharjee, R. B., Singh, A., & Mukhopadhyay, S. N. (2008). Use of nitrogen fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 199-209. **doi: 10.1007/s00253-008-1567-2.**
10. Tang, S., Liu, Y. J., Zheng, N., Li, Y., Ma, Q. X., Xiao, H., Zhou, X., Xu, X. P., Jiang, T. M., He, P., & Wu, L. H. (2020). Temporal variation in nutrient requirements of tea (*Camellia sinensis*) in China based on QUEFTS analysis. *Science Report*, 10, 1745. **doi: 10.1038/ s41598-020-57809-x.**
11. Wang, H., & Han, L. Z. (2019). Identification of four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from tea rhizosphere. *Microbiology China*, 46, 548-562. **doi: 10.13344/j.microbiol. china.180149.**
12. Gebrewold, A. Z. (2018). Review on integrated nutrient management of tea (*Camellia sinensis* L.). *Cogent Food and Agriculture,* 4 (1), 1543536. **doi: org/10.1080/23311932.2018.1543536.**
13. Dutta, J., & Thakur, D. (2017). Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, anta gonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. *PLoS ONE,* 12 (8), e0182302. **doi: 10.1371/journal.pone.0182302.**
14. Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., & Chakraborty, A. P. (2012). Induction of plant growth promotion in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium* and its bioformulations. *World Journal of Agricultural Sciences,* 8 (1), 104-112. **Corpus ID: 18543293.**
15. Nepolean, P., Jayanthi, R., Pallavi, R. V., Balamurugan, A., Kuberan, T., Beulah, T., & Premkumar, R. (2012). Role of biofertilizers in increasing tea productivity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,* 1443-1445. **doi:10.1016/S2221-1691(12)60434-1.**
16. Tennakoon, P. L. K., Rajapaksha, R. M. C. P., & Hettiarachchi, L. S. K. (2019). Tea yield maintained in PGPR inoculated field plants despite significant reduction in fertilizer application. *Rhizosphere,* 10, 100146. **doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100146.**

17. Bouyoucos, G. J. (1936). Directions for making mechanical analyses of soils by the hydrometer method. *Soil Science*, 42 (3), 225-230.
18. Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., Loeppert, R. H., Soltanpour, P. N., Tabatabai, M. A., & Sumner, M. E. (1996). Chemical methods, Methods of soil analysis. *SSSA Books Series*, 5, 961-1010.
19. Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37 (1), 29-38.
20. Rowell, D. I. (1994). Soil science method and application, longmangrop, Limitation Score. *Computers and Geosciences*, 33, 1316-1326.
21. Olsen, S. R., & Watanabe, F. S. (1957). A method to determine a phosphorus adsorption maximum of soils as measured by the Langmuir isotherm. *Soil Science Society of America Journal*, 21 (2), 144-149. **doi.org/10.2136/sssaj 1957.03615995002100020004x.**
22. Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9 (6), 778-781. **doi.org/10.1071/AR9580778.**
23. 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.**
24. Jackson, M. L. (1958). Soil Chemical Analysis. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ, 498 p.
25. Gupta, P. K. (1999). Soil, plant, water and fertilizer analysis. Agrobios, New Delhi, India. 350 p.
26. Bremner, J. M., & Malvaney, C. S. (1982). Total nitrogen. In: Page, L. (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 2(2). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, U.S.A, pp. 595-622.
27. Horneck, D. A., & Hanson, D. (2019). Determination of potassium and sodium by flame emission spectrophotometry. In Handbook of reference methods for plant analysis (pp. 153-155). CRC press.
28. Anderson, T. H., & Domsch, K. (1993). The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25 (3), 393-395. **doi.org/ 10.1016/0038-0717(93)90140-7.**
29. Jenkinson, D. S., & Ladd, J. N. (1981). Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul, E. A. and Ladd, J. N. (ed.) Soil biochemistry: Volume 5 New York Marcel Dekker, Inc. pp. 415-471.
30. USDA-NCRS. (2017). The Plants Database National Plant Data Team U Plants [http://plants. Usda. Gov, accessed 26 November].
31. Wu, S., Zhuang, G., Bai, Z., Cen, Y., Xu, S., Sun, H., Han, X., & Zhuang, X. (2018). Mitigation of nitrous oxide emissions from acidic soils by *Bacillus amyloliquefaciens*, a plant growth-promoting bacterium. *Global Change Biology*, 24 (6), 2352-2365. **doi:10.1111/ gcb.14025.**
32. Paul, E. A. ed., (2014). Soil microbiology, ecology and biochemistry. Academic press.
33. Nosheen, S., Ajmal, I., & Song, Y. (2021). Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production. *MDPI*, 13, 1-20. **doi.org/10.3390/su13041868.**
34. Dommelen, A. V., & Vanderleyden, J. (2007). Biology of the Nitrogen Cycle. *Elsevier*, 179-192.
35. Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13, 1-10. **doi:10.1186/1475-2859-13-66.**
36. Zhang, J. H., Huang, J., Hussain, S., Zhu, L. F., Cao, X. C., Zhu, C. Q., Jin, Q. Y., & Zhang, H. (2021). Increased ammonification, nitrogenase, soil respiration and microbial biomass N in the rhizosphere of rice plants inoculated with rhizobacteria. *Journal of Integrative Agricultur*e, 20 (10), 2781-2796. **doi. org/10.1016/S2095-3119(20)63454-2.**

37.Thiep, N. V., Soytong, K., Thi Kim Oanh, N., Huy Quang, P., & Hai Yen, P. (2019). Reserch and development of enzymatic producing fungi as biofertilizer for tea and arabica coffee production in Northern Vietna. *International Journal of Agricultural Technology*, 15 (5), 797-806. **http://www.ijat-aatsea.**

38.Lifeng, M., Xiangde, Y., Yuanzhi, S., Xiaoyun, Y., Lingfei, J., Yi, Ch., Kang, N., & Jianyun, R. (2021). Response of tea yield, quality and soil bacterial characteristics to long-term nitrogen fertilization in an eleven-year field experiment. *Soil Ecology*, 166, 1-11. **doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103976.**

39.Enjavi, F., Taghvaei, M., Sadeghei, H., & Hassanli, H. (2015). Effects of superabsorbent polymer on early vigor and water use efficiency of (*Calotropis procera* L.) seedlings under drought stress. *Iranian Journal of Range and Desert Research*, 22 (2), 216-230. **doi: org/10.22092/ijrdr.2015.101641.**

40.Dhar Purkayastha, G., Mangar, P., Saha, A., & Saha, D. (2018). Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PLoS ONE*, 13 (2), e0191761. **doi: 10.1371/ journal.pone.0191761.**

41.Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Chakraborty, A. P., Sunar, K., & Dey, P. L. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria mediated improvement of health status of tea plants. *Indian Journal of Biotechnology*, 12, 20-31. **WOS:000318531500003.**

42.Sharma, A. K. (2003). Biofertilizers for Sustainable Agriculture. Agrobios. India. 407p.

43.Chinnusamy, V., Schumaker, K., & Zhu, J. K. (2004). Molecular genetics perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55, 225-236. **doi: 10.1093/jxb/erh005.**

44.Nadjafi, F. (2002). Effect of irrigation intervals and plant density on quantity and quality of Isubgol (*Plantago ovate* Forsk). M.Sc. Thesis. 5, 45-52.

45.Marques, J. M., Mateus, J. R., da Silva, T. F., de Almeida Couto, C. R., Blank, A. F., & Seldin, L. (2019). Nitrogen fixing and phosphate mineralizing bacterial communities in sweet potato rhizosphere show a genotype-dependent distribution. *Diversity*, 11 (12), 231. **doi: org/10.3390/d11120231.**

46.Panda, P., Choudhury, A., Chakraborty, S., Ray, D. P., Deb, S., Patra, P. S., Mahato, B., Paramanik, B., Singh, A. K., & Chauhan, R. K. (2017). Phosphorus solubilizing bacteria from tea soils and their phosphate solubilizing abilities. *International Journal of Bioresource Science*, 4 (2), 113-125. **doi:10.5958/ 2454-9541.2017.00018.4.**