پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران
۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاته

بهمن خوش‌رو[۱]، محمدرضا ساریخانی[۲*] و میترا ابراهیمی [۳]
۱- دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک - دانشکده کشاورزی- دانشگاه تبریز
۲- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک - دانشکده کشاورزی- دانشگاه تبریز
۳- دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک - دانشکده کشاورزی- دانشگاه همدان
* مسئول مکاتبه:Email: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

در فرمولاسیون کودهای میکروبی فسفاته که غالباً به فرم گرانوله تهیه می‌شوند از باکتریهای حل‌کننده فسفات استفاده می‌شود. از جمله محدودیت‌های تولید این نوع کود، از بین رفتن باکتریها در فرایند تهیه و خشک نمودن گرانول‌ها می‌باشد. بر این اساس در این تحقیق، اقدام به جداسازی باکتریهای حل‌کننده فسفات مقاوم به دما شد، و تحمل دمایی و توانایی انحلال فسفات (از منابع سنگ فسفات و تری‌کلسیم فسفات) در ۹ باکتری جدا شده از خاک‌های بومی مورد ارزیابی قرار گرفت. از پنج باکتری (جدایه‌های RPS4، RPS6، RPS7، RPS8 و RPS9) با قابلیت تولید هاله شفاف تنها دو باکتری (RPS7 و RPS9) قادر به تحمل دمای ۵۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۶ساعت بودند. در انحلال فسفات کم‌محلول باکتری RPS4 و RPS9 به ترتیب با دارا بودن مقدار ۵۵۹/۷ و ۵۳۱/۸ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میزان حل‌کنندگی را از خود نشان دادند. نتایج زنده‌مانی نیز نشان داد که زنده‌مانی جمعیت میکروبی در حالت بدون تیمار دمایی تا ۶ ماه و در حالت تیمار دمایی به ۴ ماه کاهش یافت. شناسایی مولکولی RPS7 و RPS9 حاکی از آن بود که هر دو جدایه متعلق به گونه *Pantoea agglomerans* هستند.

واژه‌های کلیدی: کود میکروبی فسفاته، باکتریهای حل‌کننده فسفات، مقاوم به دما

مقدمه

فسفر یکی از عناصر مهم و ضروری برای گیاهان است. برای تأمین فسفر مورد نیاز از کودهای فسفره استفاده می‌شود که در شرایط خاک، به‌صورت نامحلول درآمده و از دسترس گیاه خارج می‌شود. تولید بیشتر محصولات از چالش‌های اصلی کشاورزی است. مصرف بی‌رویه کودهای فسفاته، گذشته از هزینه‌های ارزی گزاف برای خرید کود از خارج کشور، اثرات زیانباری نیز به دنبال دارد. از جمله این اثرات می‌توان به بهم‌خوردن تعادل عناصر غذایی، کاهش عملکرد محصول، تجمع بور در گیاه در حد سمیت، کاهش جذب مس، غیرمتحرک شدن آهن در خاک، ممانعت از جذب آهن توسط ریشه، مختل کردن متابولیسم روی درون گیاه، کاهش میکوریزایی شدن ریشه، آلودگی خاک به کادمیوم، تنزل کیفیت محصول، ازدیاد بار منفی خاک و آلودگی آب‌ها به فسفر و بروز پدیده اتروفیکاسیون اشاره نمود (خاوازی و ملکوتی ۱۳۸۰). به همین دلیل امروزه عملیات کشاورزی به سمت روش‌های پایدارتر و سازگار با محیط‌زیست سوق پیداکرده است (Leach and Mumford, 2008). بروز مشکلات اقتصادی و زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی و نیز توجه به قابلیت‌های ذاتی بسیار جالب و متنوع موجودات خاکزی و به‌ویژه میکروارگانیسم‌ها موجب گردیده که یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین زمینه‌های تحقیقاتی در مطالعات علمی روز، تلاش برای تولید کودهای زیستی باشد.

کودهای زیستی یکی از مهمترین اجزاء کشاورزی آلی و پایدار محسوب می‌شوند که استفاده صحیح از آنها می‌تواند ضمن افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات کشاورزی، کاهش مصرف بعضی از انواع کودهای شیمیایی و در نتیجه حفظ محیط زیست را نیز به دنبال داشته باشد (سلیم پور و همکاران ۲۰۱۰). کودهای میکروبی نیز نوعی از کودهای زیستی هستند که در آن بر بستری از مواد آلی- معدنی از میکروارگانیسم‌های مفید بهره برده می‌شود. یکی از کودهای میکروبی مهم، کود میکروبی فسفاته می‌باشد که با توجه به اهمیت فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای محصولات کشاورزی، استفاده از آن مورد توجه است (ناظری و همکاران ۲۰۱۰). کود میکروبی فسفاته ممکن است به صورت پودری یا گرانوله استفاده شود که در فرایند گرانول‌سازی، بایستی پس از اختلاط اجزاء تشکیل‌دهنده ممکن است از حرارت ملایم جهت خشک نمودن کود تولیدی

استفاده شود، همچنین این نوع کود به دلیل دارا بودن رطوبت اندک (حدود ۴٪) شرایط برای بقا باکتری نامناسب است. چنین شرایطی باعث از بین رفتن باکتریهای افزوده شده به بستر خواهد شد. بدین خاطر روش‌های متنوع و ابتکاری برای گذر از این مرحله مد نظر قرار می‌گیرد. در این پژوهش ضمن جداسازی، ارزیابی چندین باکتری مختلف مد نظر قرار گرفت، تا علاوه بر اندازه‌گیری‌های انحلال فسفات در محیط اسپربر جامد و مایع در حضور منابع مختلف فسفر (سنگ فسفات و تری‌کلسیم فسفات)، تراکم جمعیت باکتری و ماندگاری آن بر بستر سنجیده شود. ضرورت دستیابی به یک گونه میکروبی کارآمد با زمان ماندگاری بالا و قابلیت کاربرد بعنوان کودهای میکروبی فسفاته گرانوله موضوع این تحقیق است و ضرورت پرداختن به آن احساس می‌شود. در حال حاضر این نوع از باکتری‌ها کمتر در دسترس می‌باشند و تحقیقات اندکی در این زمینه صورت گرفته است، لذا در این تحقیق به این جنبه‌ها پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما

ابتدا بر روی خاکهای نمونه‌برداری شده تیمار دمایی اعمال شد (دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۶ ساعت) و سپس سری‌های رقت آنها تهیه شد و از چهار رقت پایانی (رقت 10^{-9}، 10^{-8}، 10^{-7} و 10^{-6}) در ۲ تکرار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط جامد اختصاصی Sperber انتقال داده شد. بعد از گسترده نمودن سوسپانسیون میکروبی از رقت‌های موردنظر در محیط کشت جامد اسپربر و ظاهر شدن کلنی‌ها، غربالگری بر اساس مقاومت به تیمار دمایی اولیه خاکها و در ادامه توانایی رشد در محیط اسپربر جامد، انحلال فسفات کم محلول (تشکیل هاله شفاف)، فنوتیپ و ریخت کلنی باکتری‌ها اقدام به جداسازی باکتری‌ها شد.

اعمال تیمار دمایی

ارزیابی تحمل دمایی (تیمار دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت) باکتری‌ها در سه مرحله انجام گرفت. الف: تیمار دمایی اولیه روی خاکهای نمونه‌برداری شده، ب: کشت خالص باکتری، در این حالت از هر جدایه کشت خالصی تهیه شد و سپس کشت نقطه‌ای از آن در محیط اسپربر جامد تهیه شد و ج: باکتری افزوده شده به بستر، پس از تامین جمعیت میکروبی اولیه مناسب (10^{7}) در بستر میکروبی تهیه شده (بر پایه خاک فسفات (۴۵گرم) + گوگرد (۱۵گرم) + باگاس (۳۰گرم))، شمارش جمعیت میکروبی و زنده‌مانی ارزیابی شد.

شمارش تعداد باکتری و بررسی زنده‌مانی باکتری

با توجه به اینکه تعداد جمعیت میکروبی فعال و زنده در مایه تلقیح میکروبی بایستی منطبق بر استانداردهای حاکم بر محصولات زیستی باشد، بدین منظور برآورد و شمارش میکروبی به عنوان یکی از پارامترهای مهم در کودهای میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. کود میکروبی تهیه شده به دو صورت مورد شمارش میکروبی قرار گرفت (الف: نیمی از کود نمونه، با حفظ شرایط اولیه در دمای معمولی نگهداری شد ب: نیم دیگر پس از تحمل دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت، تعیین جمعیت شد). برای مشخص نمودن جمعیت میکروبی، ابتدا سریهای رقت تهیه شد و از رقت‌های پایانی (رقت 10^{-6}، 10^{-5}، 10^{-4} و 10^{-3}) در ۲ تکرار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط اسپربر جامد انتقال داده شد (Motsara and Roy 2008). برای تهیه اولین رقت (10^{-1}) ۱۰ گرم از کودهای میکروبی تهیه شده به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد و سایر رقت‌ها تا رقت 10^{-6} در لوله های حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با انتقال ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. شمارش جمعیت در زمان شروع آزمایش (صفر)، ۲، ۴ و ۶ ماه بعد از تلقیح بر روی نمونه‌ها انجام گرفت.

آزمون نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

برای انجام این آزمون از محیط کشت Sperber (Sperber 1958 ; Motsara and Roy 2008) استفاده شد که در این محیط به ترتیب از منابع فسفر نامحلول یعنی تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات به عنوان تنها منبع فسفر استفاده شد. برای هر باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته و سطح هر پتری به سه قسمت مساوی تقسیم شد، مرکز هر قسمت با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح گردید، ظروف پتری تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه قرار داده شدند. تمامی پلیت‌ها

در سه نوبت ۳، ۵، ۷ و ۱۲ روز پس از تلقیح از انکوباتور خارج شده و قطر کلنی رشد یافته (Colony Diameter) و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات (HD) به دقت اندازه‌گیری شد، متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) در روز دوازدهم برای هر جدایه محاسبه گردید. در استفاده از سنگ فسفات هیچ هاله‌ای قابل تشخیص نبود بدین خاطر نتایج آن آورده نشده است.

آزمون کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

در این مرحله برای بررسی دقیق‌تر میزان حل‌کنندگی فسفات هر باکتری با سه تکرار در محیط کشت اسپربر مایع کشت شد. ارلن‌های حاوی محیط مایع تلقیح شده و نمونه شاهد در شیکر انکوباتور در تاریکی و با دمای ۲۸ با شیک ۱۲۰ دور در دقیق به مدت ۱۴۴ ساعت قرار گرفتند. از سوسپانسیون‌های حاصل مقدار ۲ میلی‌لیتر برداشته و پس از ۵ بار رقیق‌سازی با آب مقطر (حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر) در دور ۵۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این مرحله سلول‌های باکتری، ذرات معلق و فسفات نامحلول به کمک سانتریفوژ از سوسپانسیون جمع‌آوری و مقدار فسفر محلول در مایع صاف رویی به روش وانادات-مولیبدات اندازه‌گیری شد (Anonymous 1980). آزمون انحلال فسفات در حضور هر دو منبع فسفر (تری‌کلسیم فسفات و سنگ فسفات) به صورت جداگانه بررسی شد.

شناسایی

برای شناسایی باکتری‌ها به روش مولکولی 16S rRNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R استفاده شد (Sarikhani et al., 2013).

نتایج و بحث

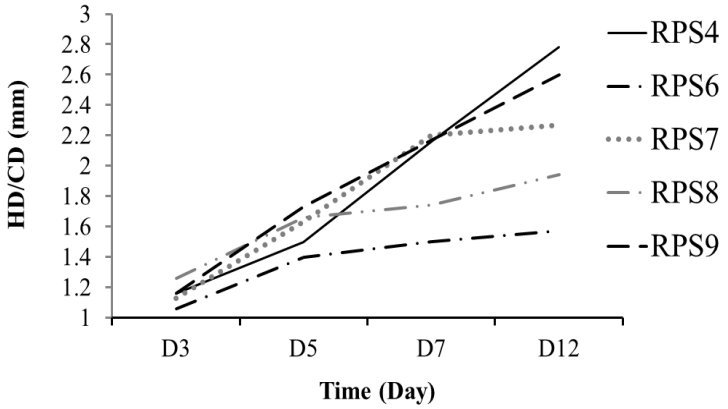
غربالگری دمایی و انحلال فسفات کم محلول

از نمونه خاکها ۹ کلنی باکتری با فنوتیپ مختلف بر روی محیط جامد اسپربر قادر به رشد بودند که از میان آنها تنها ۵ باکتری قادر به تشکیل هاله شفاف (جدایه‌های RPS4، RPS6، RPS7، RPS8 و RPS9) بودند. از بین این ۵ جدایه نیز بعد از کشت به روش نقطه‌گذاری در محیط اسپربر جامد و اعمال تیمار دمایی، تنها دو باکتری RPS9 و RPS7 قادر به رشد و زنده‌مانی تحت دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۶ ساعت بودند. فرض آزمایش بر آن است که در فرایند تولید کود میکروبی چنین دمایی در این مدت زمانی باعث ایجاد تنش دمایی و خشکی شود. به این خاطر این تیمار دمایی در آزمایش لحاظ شد.

توان حل‌کنندگی فسفات نامحلول باکتریهای بکاررفته درکودهای میکروبی

آزمون نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

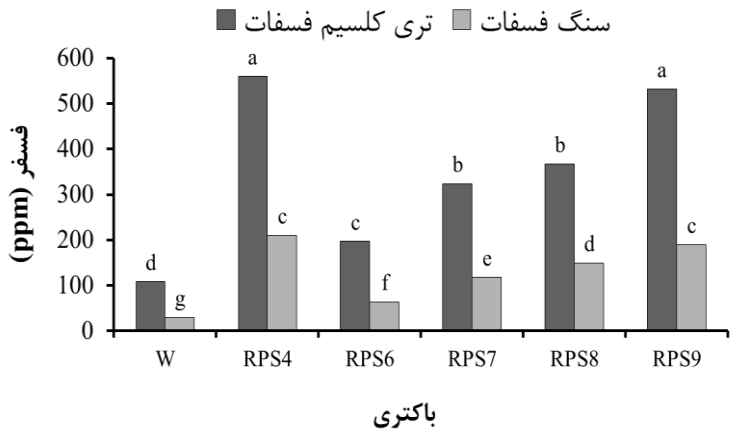
اندازه‌گیری قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول از دو منبع فسفات کم‌محلول (تری‌کلسیم‌فسفات و سنگ فسفات) و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) مشخص کرد که در محیط اسپربر تری‌کلسیم‌فسفات، باکتری RPS4 ، RPS9 و RPS7 به ترتیب با دارا بودن مقدار ۲/۷۸، ۲/۶۰ و ۲/۲۷ برای نسبت (HD/CD) بعد از گذشت ۱۲روز قدرت بالایی در امر انحلال فسفات معدنی نامحلول داشتند و دو باکتری RPS8 و RPS6 به ترتیب با دارا بودن نسبت‌های ۱/۹۴ و ۱/۵۷، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در محیط کشت اسپربر سنگ فسفات هیچ هاله‌ای مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱- توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول توسط جدایه‌های باکتریایی در اسپر جامد

آزمون کمی قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اولاً بین دو منبع فسفات کم‌محلول و ثانیاً بین باکتریها از نظر انحلال فسفات تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. در محیط اسپربر تری‌کلسیم‌فسفات مایع، باکتری RPS4 و RPS9 به ترتیب با دارا بودن مقدار ۵۵۹/۷ و ۵۳۱/۸ میلی گرم بر لیتر بیشترین میزان حل‌کنندگی را از خود نشان دادند و باکتری‌های RPS8 و RPS7 در رتبه بعدی قرار داشتند (شکل ۲). باکتری RPS6 دارای کمترین مقدار حل‌کنندگی فسفات نامحلول بود (mg/l ۱۹۶/۶). همین روند در حضور سنگ فسفات هم دیده شد. گرچه سنگ فسفات به عنوان منبع فسفر مورد استفاده در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته می‌باشد اما نتایج آزمایش نشان داد که باکتریها به میزان بالاتری قادر به انحلال فسفر از تری‌کلسیم فسفات هستند. گزارشات متعددی وجود دارد که توانایی سویه‌های مختلف باکتریایی را برای انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول همچون تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، دی هیدروکسی آپاتیت و خاک فسفات نشان می‌دهد (Goldstein 1986).



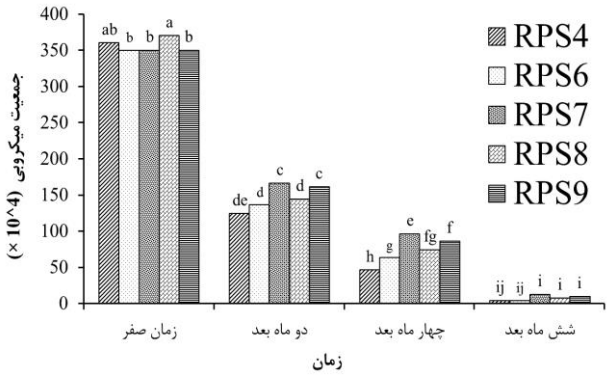
شکل ۲- مقایسات میانگین قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول در محیط اسپربر مایع

بررسی زنده‌مانی باکتریها در کود میکروبی

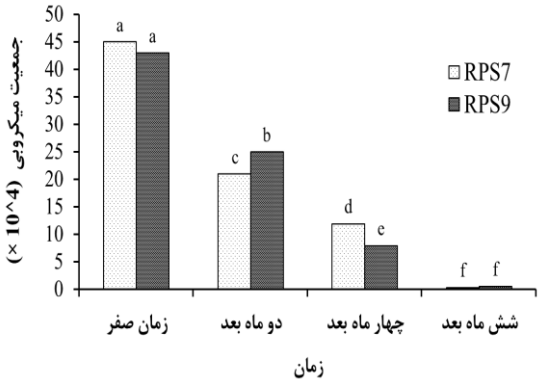
با توجه به اینکه کود میکروبی تهیه شده به دو صورت مورد شمارش میکروبی قرار گرفت (الف: نیمی از کود نمونه، با حفظ شرایط اولیه در دمای معمولی نگهداری شد ب: نیم دیگر پس از تحمل دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت، تعیین جمعیت شد). لذا نتایج بخش تیمار دمایی کودهای میکروبی فسفاته نشان داد که از میان باکتریهای مورد آزمایش، فقط باکتری‌های RPS9 و RPS7 در اثر تیمار دمایی زنده ماندند. در بخش دمای معمولی جدول تجزیه واریانس بررسی تعداد

جمعیت میکروبی فعال و نیز زندمانی باکتریها در زمان‌های صفر، دو ماه، چهار ماه و شش ماه پس از تلقیح، در محیط اسپربر نشان داد که اثر زمان بر روی زنده‌مانی باکتریهای بکاررفته در کودهای میکروبی بین زمان‌های مورد نظر کاملاً معنی‌دار می‌باشد. در شمارش جمعیت میکروبی اولیه (زمان صفر) در دمای معمولی، همه باکتریهای بکاررفته در بسترهای میکروبی دارای جمعیت قابل قبولی بودند و در بررسی تعداد جمعیت میکروبی در بستر اولیه، باکتریهای RPS4، RPS6، RPS7، RPS8 و RPS9 بترتیب با جمعیت‌های ۳/۶، ۳/۵، ۳/۶، ۳/۵، ۳/۷ و ۳/۵ ($\times 10^{6}$) مورد شمارش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که همه باکتری‌های مورد آزمایش بعد از چهارماه دارای جمعیتی معادل 10^{5} و در ماه ششم دارای جمعیت 10^{4} بودند که بنظر می‌رسد این مدت زنده‌مانی برای باکتری‌های مورد آزمایش مطلوب باشد. در شمارش جمعیت فعال کودهای میکروبی تحت تیمار دمایی، نتایج نشان داد که جمعیت اولیه بستر میکروبی (در زمان صفر) افت ۱۰ برابری نسبت به بستر بدون تیمار بدون دمایی داشته و بطوریکه جمعیت فعال در کودهای میکروبی RPS9 و RPS7 (تیمارهای مقاوم به دما) در زمان صفر به‌ترتیب ۴/۵ و ۴/۳ ($\times 10^{5}$) بوده و علی رغم اینکه جمعیت میکروبی RPS9 و RPS7 در تیمارهای غیردمایی ۶ ماه قادر به زنده‌مانی می‌باشند ولی مشاهده گردید که در تیمار های دمایی این زنده‌مانی عملاً به ۴ ماه کاهش می‌یابد. لذا بایستی توجه شود که باکتریهای مقاوم به دما با وجود اینکه در تیمار غیردمایی دارای زنده‌مانی قابل قبولی می‌باشند ولی جمعیت آنها در اثر تیمار دمایی (در مرحله خشک کردن گرانول‌های کود میکروبی) بعد از چند ماه (۴ ماه) به زیر حالت استاندارد می‌رسد.

نتایج شناسایی مولکولی باکتری‌ها به روش 16S rRNA نشان داد که هر دو باکتری مقاوم به دما (RPS7 وRPS9) متعلق به گونه *Pantoea agglomerans* هستند. آزمایشاتی بیشتری در خصوص اثربخشی این فرمولاسیون با استفاده از این باکتریها در کشت‌های گیاهی بایستی انجام گیرد تا بتوان در مورد بکارگیری این باکتریها در کود میکروبی تصمیم گرفت.



شکل ۳- زنده‌مانی یا شمار جمعیت باکتری در کودهای میکروبی (بدون اعمال تیمار دمایی) در زمان‌های مختلف



شکل ۴ - زنده‌مانی یا شمار جمعیت میکروبی در کودهای میکروبی (با اعمال تیمار دمایی) در زمان‌های مختلف

منابع

خاوازی، ک. و ملکوتی، م. ج. ۱۳۸۰. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور (مجموعه مقالات). نشر آموزش کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، تهران. ایران.

Anonymous, 1980. Soil and plant testing, as a basis of fertilizer recommendations. FAO soils bulletin, 38(2): 90-100.

Goldstein A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical prospective and future prospects. American Journal of Alternative Agriculture. 1: 51-57.

Leach A.W. and Mumford J.D. 2008. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. Environ Pollut. 151:139–147

Motsara M.R. and Roy R.N. 2008. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. Rome.

Nazery P., Kashani A., Khavazi K. and ardekani M.R. 2010. the effect of microbial bio-fertilizers containing phosphorus on the quantity and quality of white beans. National Conference of Water, Soil, Plant Science & Agricultural Machinery in IAU Dezful Branch.

Salimpur S., Khvazi K., Nadian H., Miransari M. 2010. Enhancing phosphorous availability to canola (Brassica napus L.) Using P solubilizing and sulfur oxiding bacteria. Aust.J.Crop Sci.4(5):330-334.

Sarikhani M.R., Ebrahimi M. and Fallah A.R. 2013. Isolation, identification and assessment of bioremediation potential of oil-degrading bacteria from oil-polluted sites of south of Iran.The 1st International Conference on Environmental Crises and its Solutions.13-14 Ferruary 2013.Islamic azad university, Khozestan, Kish, Iran.

Sperber J.I. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Aust. J. Agric. Res. 9: 782-787.

Isolation of temperature resistant phosphate solubilizing bacteria for application in phosphatic microbial fertilizer

B. Khoshrou[1], MR. Sarikhani[*2] and M. Ebrahimi

[1]PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[2]Associate Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran. rsarikhani@yahoo.com
[3]PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-AliSina University of Hamedan, Iran
*Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract
Phosphatic microbial fertilizers (PMF) which formulated using phosphate solubilizing bacteria (PSB) are being used in granular or powder forms. One of major limitation of these kinds of biofertilizers is decline or loss of PSB viable cell in the granule preparation process. Accordingly, in this study temperature tolerance and the phosphate solubility ability of nine isolated bacteria were evaluated. Five (RPS4, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9) out of nine isolated bacteria were able to solubilize mineral phosphate (TCP and RP) but only two isolates (RPS7 and RPS9) were resistant to temperature (55 °C for 16 h). The highest P solubility was recorded in the assay medium in presence of TCP which inoculated by RPS4 and RPS9 isolates (559.7 and 531.8 mg/l, respectively). Also results displayed that the survival of viable cell in formulated PMFs was up to 6 and 4 months in the case they treated without or with above mentioned temperature treatment, respectively. Molecular identification of the isolates RPS7 and RPS9 revealed that they belonged to *Pantoea agglomerans*. It seems that these isolated and identified bacteria are good candidate to be used in formulation of PMF. However, their interaction with plant under greenhouse culture and its effectiveness should be examined in other studies.

Key Words: Phosphatic microbial fertilizer, Phosphate solubilizing bacteria, Thermal tolerance, Viability