گزینش و شناسایی جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات ازخاک ریزوسفری ذرت و سویا

علی اصغر اردشیری لاجیمی[۱]، رضا قربانی نصرآبادی[۲*]، مجتبی بارانی مطلق[۳] و سید علیرضا موحدی نائینی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۲- استادیارگروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۳- دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۴/۰۹/۰۲
پذیرش نهایی:۱۳۹۵/۰۲/۱۲

کلمات کلیدی:
حل کننده فسفات،
خواستگاه کربن و نیتروژن،
تری کلسیم فسفات،
فسفات آلومینیوم

* عهده دار مکاتبات

Email: rgnasr@yahoo.com

چکیده

باکتری‌های خاک، کارکرد ویژه ای در چرخه فسفر خاک دارند؛ آنها از راه حل‌کردن فسفر و افزایش دسترسی گیاهان به فسفر می توانند مایه افزایش رشد گیاه شوند. در این بررسی باکتری‌های حل کننده فسفات از ریزوسفر ذرت و سویا جداسازی و توانایی آزادسازی فسفر از تری‌کلسیم فسفات و آلومینیوم فسفات در محیط‌های بافری و نابافری شده با بهره گیری منابع گوناگونی از کربن و نیتروژن بررسی شد. روی هم‌رفته، ۱۷۵ جدایه خالص سازی و پس از آزمون های نخستین بر روی محیط جامد National Botanical Research Institute Phosphorus (NBRIP) ، ٤٠ جدایه از آنها برای سنجش توان آزادسازی فسفر در محیط مایع گزینش شدند. سنجش توان آزادسازی فسفر در محیط مایع نشان داد که توان‌مندی جدایه ها در آزادسازی فسفر از تری‌کلسیم فسفات بسیار بیش تر از آلومینیوم فسفات بود. گلوکز و سولفات آمونیوم بهترین منابع کربن و نیتروژن باکتری ها برای آزادسازی فسفر می‌باشد و همچنین اندازه آزادسازی فسفر در شرایط بافر شده بسیار کاهش یافت. جدایه های گزینش شده توان آزادسازی فسفر بیش تری را در محیط NBRIP در برابر محیط پایکووسکی از خود نشان دادند. بر پایه یافته های به‌دست آمده از توالی خوانی جدایه‌های برتر از نظر توان انحلال فسفات نامحلول، هفت جدایه متعلق به جنس *Enterobacter* و یک جدایه متعلق به جنس *Pantoea* بود. نتایج به دست آمده نشان داد که توان انحلال فسفر در جدایه‌های مورد بررسی به منبع فسفر، کربن و نیتروژن مورد استفاده و به خصوص به شرایط بافری محیط کشت بستگی دارد.

مقدمه

فسفر خاک یکی از عناصر غذایی مهم گیاهان کشاورزی است و به دلیل کمبود منابع آن به عنوان یکی از چالش‌های جهانی زیست محیطی در قرن ۲۱ در نظر گرفته شده است. کارایی و مدیریت کاربرد فسفر در سیستم‌های کشاورزی برای رسیدن به بیشینه کارکرد گیاه بدون آسیب به کیفیت محیط زیست، ضروری است (۱۳). افزون بر جایگاه ویژه تغذیه ای فسفر، افزایش بیش از اندازه بهای کودهای شیمیایی فسفره و کمبود کانسارهای آن برای ساخت این دسته از کودهای شیمیایی، از دلایل توجه بیش تر به فسفر در پژوهش های کشاورزی بوده است.

طبیعت خاک‌های کربناتی که بخش بزرگی از زمین های کشاورزی و باغی کشورمان را نیز شامل می‌گردد، مایه آن شده تا بهره گیری از کودهای شیمیایی فسفره از کارایی کمی در این‌گونه زمین‌ها برخوردارباشند. بنابراین یکی از اهداف کشاورزی پایدار برای کاهش عوارض ناخواسته کاربرد کودهای شیمیای فسفاته، بهره‌گیری از ریزجانداران حل کننده کانی‌های فسفات است (۸).

ریزجانداران کارکرد ویژه ای در چرخه ژئوشیمیایی عناصر غذایی، بهسازی و پایداری شیمیایی خاک و آزادسازی عناصر غذایی برای رشد گیاهان دارند. ریزوسفر جایگاهی است که ریزجانداران به فراوانی در آن یافت می شوند زیرا کربن آلی برای زندگی و فعالیت آنها در این زیستگاه فراوان‌تر از دیگر بخش‌های خاک است. همچنین ریزجانداران خاک از بخش‌های ضروری محیط‌های طبیعی بوده و در برآورد عناصر غذایی برای گیاهان میزبان کارایی ویژه ای دارند(۱۵).

ریزجانداران نقشی بنیادین در چرخه بیوشیمیایی و زیست فراهمی فسفر دارند (۹) و می توانند کانی‌های فسفره نامحلول در ریزوسفر را به ریخت‌های قابل جذب فسفر برای گیاه دگرگون کنند. کاهش pH و ساخت و رها سازی اسیدهای آلی از گروه سازوکارهایی است که در حل کردن فسفر کارایی دارند. در ریزجانداران گوناگون، قندهای محیط کشت در مسیرهای متابولیکی ویژه ای بهره گیری شده و از آنها اسیدهای آلی گوناگونی ساخته و رها می شود (۲۵). بسیاری از گونه‌های *Pseudomonas, Mycobacterium, Bacillus, Enterobacter, Agrobacterium, Achromobacter, Erwinia, Flavobacterium,* و *Escherichia* توان آزادسازی فسفر از فسفات‌های معدنی نامحلول را دارا می باشند (۳). برهم کنش‌های کربن و نیتروژن بر حل کردن فسفر در قارچ‌ها نشان داده شده است و گلوکز کاراترین عامل در این فرآیند است؛ همچنین پیامد کاربرد مواد کربنه گوناگون بر جدایه‌های قارچی ناهمانند است و نمی‌توان یافته‌های گونه‌های قارچی را به دیگر گونه‌ها تعمیم داد. روی‌هم‌رفته حل‌کردن فسفات در کاربرد نیتروژن آلی کم‌تر از هنگامی است که نیتروژن کانی در زیستگاه ریزجانداران بهره‌گیری شود و ماهیت و زیست فراهمی نیتروژن می‌تواند سازوکار حل کردن فسفر را دگرگون کند (۲۳). پیامد کاربرد کربن و نیتروژن به ریخت های گوناگون در آزادسازی فسفراز کانی‌های فسفاتی در برخی جدایه‌های باکتریایی مانند *Burkholderia cepacia* (۲۱) و *Pantoea aglomerans* (۲۴) گزارش شده است. همچنین فرهت و همکاران(۲۰۰۹) گزارش کردند که باکتری *Seratia marcescens* توان حل‌کردن سنگ فسفات با بهره گیری از منابع گوناگون کربن را دارد و بهره گیری از گلوکز و گلیسرول مایه بیش ترین آزادسازی فسفر می شود (۵). اندازه فسفر آزاد شده از کانی‌های فسفر به گونه ریزجاندار، شرایط کشت و اندازه حلالیت کانی فسفره بستگی دارد (۲۶). حل‌کردن فسفر به کربن آلی که به آسانی قابل تجزیه هستند، وابستگی بیش تری دارد؛ بنابراین نبود همخوانی نتایج به دست آمده درباره توان‌مندی حل کردن فسفرریزجانداران در شرایط آزمایشگاهی با کارایی آزادسازی فسفر آن‌ها در خاک می‌تواند وابسته به کمبود کربن آلی ساده یا دشواری‌های ریززیستگاه‌ها در خاک باشد (۱۹).

با توجه به سازگاری ریزجانداران با زیستگاه ویژه و بومی هر سرزمین بایستی جدایه‌های میکروبی را در همان

سرزمین‌ها به کار برد که از آن جداسازی شده‌اند، بنابراین هدف از این پژوهش جداسازی و گزینش جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات (PSB[1]) ازخاک ریزوسفری برخی مناطق زیر کشت ذرت و سویا در استان گلستان و همچنین بررسی پیامد کاربرد ریخت های گوناگون کربن و نیتروژن بر توان آزادسازی فسفر از کانی‌های فسفات نامحلول جدایه های برگزیده بود.

نمونه‌برداری

برای شناسایی باکتری حل‌کننده فسفات، ۲۲ نمونه خاک از ریزوسفر ذرت و سویا از کشتزارهای شرق استان گلستان، برداشت و بی درنگ به آزمایشگاه رسانده شد.

کشت و جداسازی باکتری‌ها در کشتگاه های جامد

برای جداسازی، در آغاز ۱۰ گرم از خاک ریزوسفر برداشته و در ۹۰ میلی‌لیتر آب استریل ریخته و برای ۳۰ دقیقه بر روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه گذاشته شد؛ پس از تکان دادن، آمیخته را برای ۱۰ دقیقه آرام گذاشته و سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و به لوله آزمایش دارای نه میلی‌لیتر آب، افزوده و سری رقت‌ها، برای کشت بر کشتگاه جامد آماده گردید.

برای جداسازی از دو کشتگاه بهره گیری شد. در روش یکم، ۱۰۰ میکرولیتر از سری رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-5} آماده شده از سوسپانسیون خاک را روی کشتگاه NBRIP (بر حسب گرم در لیتر شامل ۱۰ Glucose، ۵ $MgCl_2$، ۰/۲۵ $MgSO_4$، ۰/۲ KCl، ۰/۲ $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵ $CaCl_2$، ۵ Ca_3po_4 و ۱۵ Agar) دارای بازدارنده قارچی سیکلوهگزایمید (۱۰۰ میکروگرم درمیلی‌لیتر) مایه زنی نموده و برای هفت روز در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس خوابانیده شدند. کلنی‌هایی که در پیرامون آنها هاله پدید آمد و از دیدگاه ریخت شناسی ناهمانند بودند، برای جداسازی و بررسی بیش تر گزینش شدند.

درکشتگاه آگار مغذی، سری رقت‌های 10^{-5} تا 10^{-8} آماده شده را بر کشتگاه کشت داده و کلنی‌های ناهمانند از دیدگاه ریخت شناسی گزینش، جداسازی و بررسی شدند.

پس از گذشت زمان خوابانیدن، ۱۰۴ جدایه از روی کشتگاه آگار مغذیو ۷۱ جدایه از کشتگاه NBRIP جداسازی شدند. از همه جدایه‌های کشت شده با بهره‌گیری از دو کشتگاه یاد شده،۸۱ جدایه از ریزوسفر ذرت و ۹۴ جدایه را از ریزوسفر سویا به‌دست آمد و برای آزمون هاله روشن در کشتگاه جامد دارای فسفر کم محلول از آنها بهره گیری شد پس از جداسازی باکتری ها ، در آغاز آنها را در محیط پیش کشت مایع مغذی رشد داده و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آنها را بر روی محیط NBRIP جامد قطره گذاری و به مدت ۹۶ ساعت دردمای ۲۸ درجه سلسیوس خوابانیده و قطر هاله و کلنی اندازه‌گیری شد. جدایه‌هایی که توان تشکیل هاله در محیط مذکور را داشتند، به عنوان حل‌کننده‌های بالقوه فسفات در نظر گرفته شدند.

توانایی حل کردن فسفات‌های کانی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات و فسفات آلومینیوم) در کشتگاه مایع

توانایی حل‌کردن فسفات‌های کانی (تری‌کلسیم فسفات و آلومینیوم فسفات) جدایه‌های برگزیده در کشتگاه NBRIP مایع دارای ۲ گرم تری‌کلسیم فسفات یا ۱/۵ گرم آلومینیوم فسفات در لیتر اندازه‌گیری شد. برای این کار در آغاز جدایه‌ها را در کشتگاه مایع مغذی مایه زنی کرده و برای ۴۸ ساعت بر روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری نموده و سپس یک میلی‌لیتر از این کشت را به کشتگاه NBRIP مایه زنی نموده و در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، pH در محلول رویی اندازه‌گیری و پنج میلی‌لیتر از آن برداشته و سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور در پنج دقیقه) شد. اندازه فسفر رها شده به روش آمونیوم مولیبدات وانادات و در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

1- Phosphate Solubilizing Bacteria

پیامد خواستگاه کربن آلی بر آزادسازی فسفر

کربن آلی فراهم شده از مواد آلی گوناگون بر اندازه آزادسازی فسفر از کانی‌های فسفاتی نامحلول می‌تواند پیامدهای ویژه‌ای داشته باشد. برای بررسی پیامد خواستگاه کربن آلی بر آزادسازی فسفر، گلوکز کشتگاه NBRIP با دیگر مواد آلی کربن دار مانند، ساکارز، فروکتوز، عصاره مالت و گلیسرول جایگزین و اندازه فسفر آزاد شده و دگرگونی pH در کشت جدایه‌های برگزیده اندازه‌گیری شد.

پیامد خواستگاه نیتروژن بر آزادسازی فسفر

برای بررسی پیامد خواستگاه نیتروژن برای باکتری‌ها بر آزادسازی فسفر در کشتگاه NBRIP، از نیترات سدیم (۰/۲۶ گرم در لیتر) و آرژینین(۰/۱۳ گرم درلیتر) به جای سولفات آمونیوم بهره‌گیری گردید. پس از آماده کردن محیط کشت و تنظیم pH، یک میلی‌لیتر از پیش‌کشتگاه به کشتگاه NBRIP دارای نیترات سدیم و یا آرژنین افزوده شد و میزان فسفر آزاد شده و دگرگونی pH کشتگاه‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های برگزیده اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری توانایی آزادسازی فسفات‌های کانی در محیط بافر

خاک محیطی بافر است و برای بررسی آزادسازی فسفر در شرایط بافر از محیط NBRIP بافر شده با محلول ۱۰۰ میلی‌مولار تریس با pH=۷ بهره‌گیری شد. از آنجا که خواستگاه نیتروژن باکتری‌ها بسته به این که نیتراتی و یا آمونیومی باشد، پیامد های ناهمانندی منبع بر دگرگونی pH زیستگاه باکتری ها دارد، از دو خواستگاه نیترات سدیم و سولفات آمونیوم بهره‌گیری گردید. اندازه آزادسازی فسفر و دگرگونی pH این زیستگاه بافری شده در کشت جدایه-های برگزیده اندازه‌گیری شد.

سنجش آزادسازی فسفر در محیط‌های غربالگری مختلف

برای بررسی توان آزادسازی فسفر باکتری‌های برگزیده در کشتگاه‌های گوناگون، از کشتگاه های اسپربر[1] (بر حسب گرم در لیتر شامل: ۱۰ Glucose، ۰/۰۵ yeast extract، ۰/۲ $MgSO_4$، ۰/۱ $CaCl_2$ ، ۲ Ca_3po_4)(اسپربر، ۱۹۵۷)، پایکووسکی[2] (۱۰ Glucose، ۰/۵ yeast extract، ۰/۲ NaCl، ۰/۱ $MgSO_4$، ۰/۲ KCl، ۰/۵ $(NH_4)_2SO_4$، ۲ Ca_3PO_4، ۰/۰۰۲ $MnSO_4$، ۰/۰۰۲ $FeSO_4$ (تمامی واحدها بر حسب گرم در لیتر))(پایکووسکی، ۱۹۴۸) و NBRIP (نوتیال ، ۱۹۹۹) بهره گیری شد. اندازه فسفر آزادشده به روش آمونیوم مولیبدات وانادات و در طول موج ۴۷۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

شناسایی جدایه‌ها

پس از انجام آزمایش‌های وابسته به آزادسازی فسفر از کانی‌های فسفاتی، در پایان هشت جدایه گزینش و شناسایی شد. در آغاز جدایه‌ها را در کشتگاه LB[3] (۱۰ گرم tryptone ، ۵ گرم yeast extract، ۵ گرم NaCl) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت رشد داده و سپس آنها را سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور برای ۱۰ دقیقه) نموده و پلت یاخته‌ای آنها گردآوری گردید. استخراج DNA با بهره‌گیری از کیت (Qiagen DNeasy blood and tissue kit) انجام شد. از پرایمرهای عمومی 27f (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) و1492r (ACGGGCGGTGTGTRC) برای تکثیر DNA بهره‌گیری شد. آمیخته واکنش شامل دو میکرولیتر dNTP (۰/۲ میلی‌مول)، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۵ پیکومول)، ۲/۵میکرولیتر بافر(۱۰x)، یک میکرولیتر DNA و ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز(0.5 U) و حجم پایانی آن با آب دیونیزه سترون به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برای فراوان سازی DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه آغاز و پس از آن ۳۵ چرخه فراوان سازی شامل مراحل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر

1- Sperber

2- Pikovskaya

3- Luria Bertani

در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۵ ثانیه انجام شد؛ در پایان نیز ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای پایان ساخت DNA نگه داشته شدند. بعد از اطمینان از کیفیت محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمزار ، خوانش توالی ها انجام و بعد از ویرایش با بهره‌گیری از برنامه Blast با سایر توالی-های ثبت شده در پایگاه اطلاعات ژنومی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شد.

تجزیه آماری

آزمون‌های مختلف در مورد توان حل‌کنندگی فسفات وآزادسازی آن از منابع مختلف کربن و نیتروژن در شرایط آزمایشگاهی در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از جدایه‌های مختلف باکتریایی (تیمارها) و در ۳ تکرار انجام شد.تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون LSD($p<0.05$) انجام گردید.

نتایج و بحث

کشت و جداسازی باکتری‌ها

براساس آزمون پیدایش هاله شفاف در اطراف کلنی بر روی دو کشتگاه پایه نوترینت آگار و NBRIP از ۱۷۵ جدایه ۴۰ جدایه انتخاب شد که ۹ جدایه هیچ هاله‌ای تشکیل نداده و ۳۱ جدایه دیگر از لحاظ اندازه تشکیل هاله تفاوت قابل توجهی با یکدیگر داشتند. ۱۱ جدایه قطر هاله به کلنی کم‌تر از ۱/۵ ، ۱۴ جدایه ۱/۵ تا ۳ و در شش جدایه هم اندازه شاخص مذکور بیش از ۳ بود. بیش‌ترین اندازه قطر هاله به کلنی مربوط به جدایه ۴۰ که از ریزوسفر سویا خالص شده و برابر ۴/۲۱ بود (جدول ۱).

جدول (۱) نسبت قطر هاله روشن به کلنی در جدایه‌های متقاوت پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون

Table (1) Halo to colony diameter ratio of different isolates after 96 hours incubation

شماره جدایه‌ها Isolates No.	نسبت قطر هاله+ کلنی به کلنی Halo+ colony/colony	شماره جدایه‌ها Isolates No.	نسبت قطر هاله+ کلنی به کلنی Halo+ colony/colony
3	0.0	121	1.72 ijk
6	1.11 o	122	1.10 mn
11	1.91 fgh	123	1.13 mn
15	0.0	129	3.11 c
17	1.83 ghi	130	1.11 mn
18	2.38 de	131	1.36 lmn
21	1.50 jk	137	1.41 klmn
27	1.81 ghi	141	1.33 lmn
29	2.0 fg	142	3.12 c
30	1.54 jk	143	1.11 mn
33	1.67 ijk	144	1.39 klmn
35	2.54 d	147	3.31 c
38	3.3 c2	149	1.7 ijk
39	3.50 b	152	0.0
40	4.21 a	154	2.03 fg
78	0.0	156	0.0
110	1.96 fgh	157	0.0
115	1.37 klmn	160	0.0
117	0.0	161	0.0
129	1.96 fgh	171	1.98 fgh

حروف یکسان نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با بهره‌گیری ازآزمون LSD می‌باشد

Numbers with the same letters are not significantly ($p<0.05$) different by LSD test.

اندازه‌گیری حل‌کردن فسفات‌های معدنی در محیط مایع

از ۴۰ جدایه مورد بررسی، ۱۹ جدایه از ریزوسفر ذرت و ۲۱ جدایه از ریزوسفر سویا جداسازی شده بودند و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی شدند، ۱۰ جدایه در زمان ۲۴ ساعت، ۱۶ جدایه در زمان ۴۸ ساعت، ۹ جدایه در زمان ۷۲ ساعت و ۵ جدایه در زمان ۹۶ ساعت حداکثر حل‌کردن را نشان دادند. تمامی جدایه‌های مورد بهره‌گیری در محیط مایع NBRIP حل‌کردن فسفات و کاهش pH را نشان دادند که بیش‌ترین مقدار حل‌کردن به میزان۲۴۵ میلی‌گرم بر لیتر (معادل ۶۱/۵ درصد فسفات موجود در تری‌کلسیم فسفات) مربوط به جدایه ۱۲۹ در زمان ۹۶ ساعت با pH=۳/۱ و کم‌ترین اندازه حل‌کردن (۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) متعلق به جدایه ۱۶۱ در زمان ۲۴ ساعت بود. بیش‌ترین اندازه کاهش pH در جدایه ۱۲۹ و کم‌ترین کاهش هم مربوط به جدایه ۱۶۱ بود. همچنین بین اندازه حل‌کردن فسفات و pH همبستگی منفی معنی‌داری وجود داشت ($r = -۰/۶۳۲$ ،$P<۰/۰۰۱$)؛ اما در منبع فسفات آلومینیوم، بیش‌ترین حل‌کردن فسفر مربوط به جدایه ۱۲۳ با ۲۳/۱ میلی‌گرم بر لیتر و با pH نهایی ۴/۱۵ و کم‌ترین اندازه حل‌کردن هم مربوط به جدایه ۱۴۱ به اندازه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر و با pH نهایی ۳/۴۳ بود. توانایی جدایه‌ها در آزادسازی فسفر از دو منبع فسفاته کاملاً ناهمانند بوده و جدایه‌ای که بیش‌ترین اندازه حل‌کردن فسفر از منبع تری-کلسیم‌فسفات را داشت، در آزادسازی فسفر از منبع فسفات آلومینیوم توانایی متوسطی (۷/۸ میلی‌گرم در لیتر) را از خود نشان داد.

اثر منابع کربن بر آزادسازی فسفر از تری‌کلسیم فسفات

در بررسی اثرات مختلف منابع کربن در محیط NBRIP هشت جدایه برگزیده، مشخص شد که گلوکز بهترین منبع برای تمامی جدایه‌ها می‌باشد، پس از گلوکز باکتری‌های مختلف منابع ناهمانندی را به عنوان منبع ترجیحی گلوکز مورد بهره‌گیری قرار دادند. همچنین در منبع گلیسرول تمامی جدایه ها کم‌ترین اندازه آزادسازی فسفر را از خود نشان دادند (شکل ۱). بهره‌گیری از گلوکز در مقایسه با گلیسرول منجز به افزایش ۲/۸ تا ۲۰/۷ برابری آزادسازی فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات در جدایه های مختلف گردید.

اثر منابع مختلف نیتروژن بر آزادسازی فسفر از تری‌کلسیم فسفات

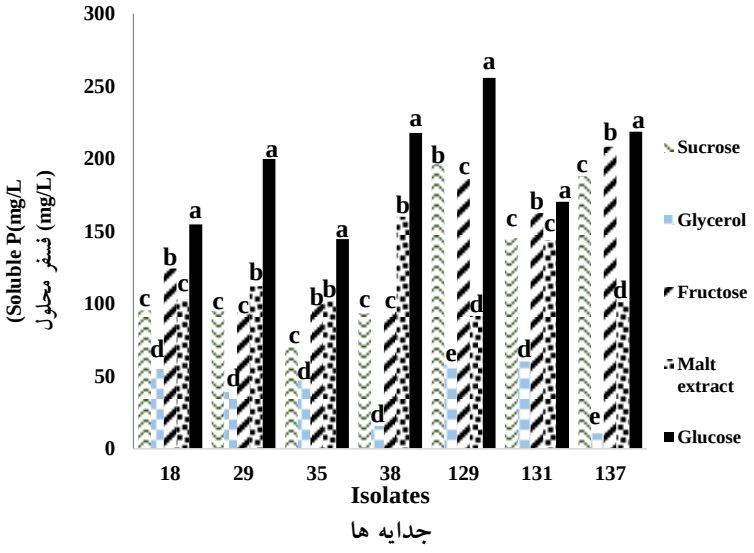
با جایگزینی نیترات‌سدیم و آرژینین به جای آمونیوم-سولفات در محیط NBRIP مقدار آزادسازی فسفر به طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار گرفت. بیش‌ترین حل‌کردن فسفات در جدایه‌های منتخب در حضور آمونیوم سولفات و کم‌ترین مقدار با بهره‌گیری از آرژینین به دست آمد. بیش‌ترین مقدار آزادسازی در منبع آمونیوم سولفات مربوط به ایزوله ۱۲۹ به مقدار ۲۵۰/۵۴ میلی‌گرم بر لیتر (معادل ۶۲/۶۳ درصد فسفر موجود در تری‌کلسیم فسفات) و کم‌ترین مقدار نیز مربوط به ایزوله ۳۵ و به اندازه ۱۴۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر (معادل ۳۵/۰۵ درصد فسفات) بود. بیش ترین مقدار حل‌کردن در منبع سدیم نیترات مربوط به جدایه ۱۳۷ به اندازه ۱۷۸ میلی‌گرم بر لیتر و کم‌ترین مقدار هم مربوط به جدایه ۱۸ و به اندازه ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بوده است. که به ترتیب معادل ۴۴/۵ و ۲۰ درصد فسفات موجود در محیط می‌باشد. در منبع دارای آرژینین نیز بیش‌ترین اندازه حل‌کردن مربوط به جدایه ۲۹ و به اندازه ۸۹ میلی‌گرم بر لیتر (۲۲/۲۵ درصد فسفات موجود در محیط کشت) و کم‌ترین اندازه نیز مربوط به جدایه ۱۳۷ به اندازه ۱۲ میلی-گرم بر لیتر (۳ درصد فسفات موجود) بود. نکته حائز اهمیت آن است که با تغییر منبع نیتروژن، افزون بر تغییر در اندازه آزادسازی فسفر، جدایه‌های ناهمانندی، حداکثر آزادسازی فسفر را از خود نشان دادند و همان طور که در بالا ذکر شد جدایه‌های ۱۲۹، ۱۳۷ و ۳۵ به ترتیب در محیط دارای منبع سولفات‌آمونیوم، نیترات سدیم و آرژینین بیش‌ترین حل-کردن فسفات را داشتند(شکل ۲).

جدول (۲) توانمندی حل‌کردن فسفات‌های معدنی نامحلول در جدایه‌های حاصل از ریزوسفر ذرت و سویا در محیط NBRIP مایع

Table (2) Insoluble inorganic phosphates solubilizing capability of the isolates from soybean and corn rhizosphere in NBRIP broth medium

منبع جداسازی Isolation source	حل‌کردن TCP(میلی‌گرم در لیتر) TCP solubilization (mg/L)	pH در محیط دارای TCP[2] pH in TCP medium	حل‌کردن فسفات آلومینیوم (میلی گرم در لیتر) Al-P solubilization (mg/L)	pH در محیط دارای فسفات آلومینیوم pH in Al-P[1] medium	زمان حداکثر حل‌کردن (ساعت) Maximum solubilization time (h)	جدایه‌ها Isolates
Maize	47.49	5.01	1.77	4.16	24	3
Maize	58.46	5.88	6.50	5.15	48	6
Maize	50.02	6.05	4.41	5.71	24	11
Maize	29.38	6.21	5.40	3.66	48	15
Maize	191.2	4.45	5.62	2.63	48	17
Maize	144.6	4.41	7.20	4.15	48	18
Maize	182.2	4.91	14.10	3.47	72	21
Soybean	142.7	3.31	0.20	4.70	72	27
Soybean	199.8	3.47	11.80	3.85	24	29
Soybean	138.9	4.57	19.80	4.40	24	30
Maize	127.2	3.40	17.71	4.23	48	33
Maize	134.4	3.61	13.30	3.83	24	35
Soybean	217.7	3.51	12.60	2.97	24	38
Soybean	204.1	4.18	22.71	2.98	48	39
Soybean	184.2	4.17	2.36	2.76	24	40
Soybean	3.14	4.43	1.71	3.30	24	78
Maize	139.4	3.98	9.89	4.14	48	110
Maize	112.9	3.32	0.76	4.90	48	115
Soybean	131.3	4.09	0.91	5.55	72	117
Maize	159.2	3.32	7.06	3.77	48	120
Maize	115.1	3.17	21.19	4.74	48	121
Maize	78	5.43	20.97	4.07	48	122
Maize	161.7	4.12	23.1	3.42	72	123
Soybean	245.4	3.10	7.80	4.34	96	129
Soybean	172.7	4.22	3.42	4.33	96	130
Soybean	136.1	3.70	7.50	4.24	48	131
Soybean	219.9	3.21	11.50	3.65	96	137
Soybean	130.2	4.37	0.01	3.43	96	141
Soybean	154	4.13	1.70	4.64	48	142
Soybean	139.4	4.22	0.60	3.55	96	143
Soybean	168.5	3.97	1.93	3.36	72	144
Soybean	140	4.01	6.44	3.62	72	147
Soybean	176.1	4.13	3.65	2.77	24	149
Soybean	134.4	3.61	2.28	3.45	48	152
Soybean	140.6	4.24	2.66	2.81	48	154
Soybean	93.9	4.30	11.35	3.73	72	156
Maize	137	4.21	4.13	3.29	72	157
Maize	44.1	6.08	2.53	3.68	72	160
Maize	10.31	6.51	9.93	4.59	24	161
Maize	151.7	4.12	5.27	3.56	48	171

1- Aluminum phosphate; 2- tri-calcium phosphate

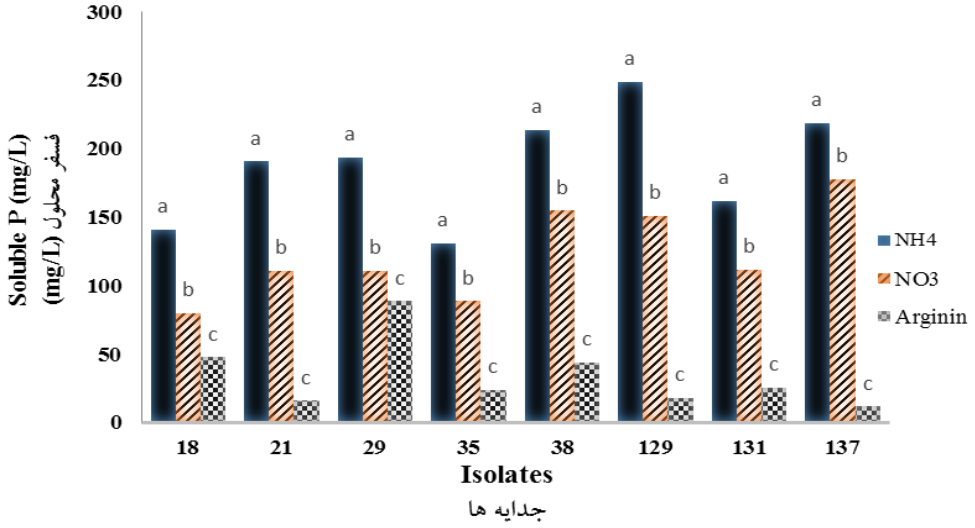


شکل (۱) اثر منابع مختلف کربن بر آزادسازی فسفر از تری‌کلسیم فسفات

Figure (1) Effect of different carbon sources on P release from tri-calcium phosphate

حروف یکسان نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با بهره‌گیری ازآزمون LSD می‌باشد

Numbers with identical letters are not significantly (p<0.05) different by LSD test



شکل (۲) اثر منابع مختلف نیتروژن بر آزادسازی فسفر از تری‌کلسیم فسفات

Figure (2) Effect of different nitrogen sources on P release from tri-calcium phosphate

اثر منابع مختلف نیتروژن بر آزادسازی فسفر از فسفات آلومینیوم

بر اساس نتایج حاصل از بررسی حل‌کردن فسفات آلومینیوم، همانند تری‌کلسیم فسفات، منبع سولفات آمونیوم موثرتر از دو منبع دیگر بود (شکل ۳). جدایه شماره ۱۸ جز در منبع سولفات‌آمونیوم در دو منبع دیگر هیچ انحلالی نشان نداد. بیش‌ترین اندازه حل‌کردن در منبع سولفات‌آمونیوم در بین این ۸ جدایه منتخب مربوط به جدایه ۲۱ و به اندازه ۱۴/۱ میلی‌گرم بر لیتر و با pH نهایی ۲/۸۵ و کم‌ترین اندازه حل‌کردن مربوط به جدایه

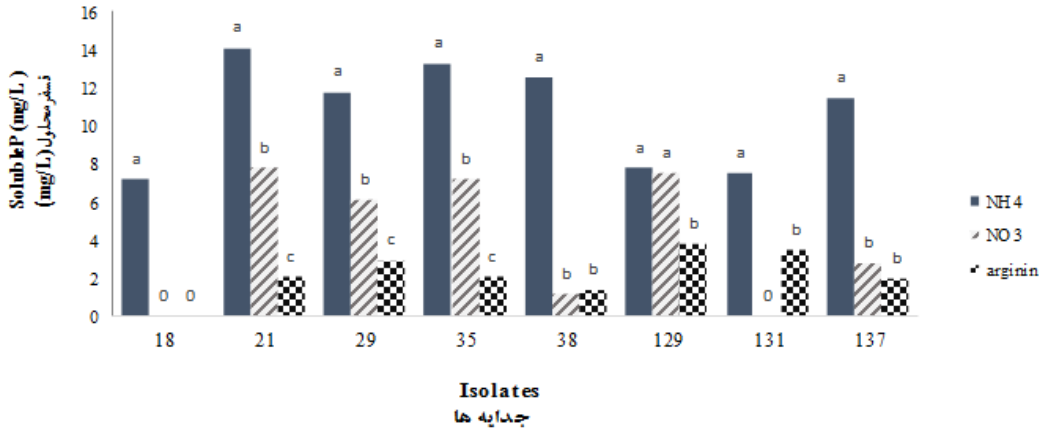
۱۸ با ۷/۱ میلی‌گرم بر لیتر با pH نهایی ۳ می‌باشد. در منبع نیترات سدیم نیز بیش‌ترین مقدار حل‌کردن باز هم مربوط به جدایه ۲۱ با ۷/۸ میلی‌گرم بر لیتر و با pH نهایی ۲/۸۵ می‌باشد و جدایه‌های ۱۳۱و ۱۸ با وجود کاهش pH تا ۳/۸ و ۳/۲۴ هیچ حل کردنی نشان ندادند و این نشان می‌دهد که حل‌کردن آلومینیوم فسفات بر خلاف تری‌کلسیم فسفات به کاهش pH مرتبط نبوده و روش حل‌کردن آلومینیوم فسفات، روشی غیر از کاهش pH می‌باشد. در مورد منبع آرژینین نیز بیش‌ترین حل کردن مربوط به جدایه ۱۲۹ و به اندازه ۳/۸ میلی‌گرم بر لیتر و با pH نهایی ۳/۹۴ و جدایه ۱۸ با وجود کاهش pH محیط به ۳/۳۷ هیچ حل‌کردنی را نشان نداد (شکل ۳).

توانایی آزادسازی فسفر در محیط بافر

شکل‌های ۴ و۵ اندازه حل‌کردن فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات را در شرایط بافر با منبع نیتروژنی سولفات‌آمونیوم یا نیترات سدیم را نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد که توانایی جدایه‌ها درآزادسازی فسفر از محیط بافر به شدت کاهش یافته است، به طوری‌که اندازه آزادسازی فسفر در جدایه۱۲۹، که بیش‌ترین اندازه حل‌کردن (۲۴۹ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط غیربافر دارای سولفات آمونیوم را داشت، به اندازه ۱۸ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط بافر کاهش یافت. بیش‌ترین اندازه آزادسازی حل‌کردن در شرایط بافر دارای سولفات آمونیوم مربوط به جدایه ۱۳۷ و به اندازه ۸۸ میلی‌گرم در لیتر بوده است (شکل ۴). در محیط دارای نیترات سدیم در هر دو حالت بافر و غیر بافر جدایه ۱۳۷ بیش‌ترین توان‌مندی آزادسازی فسفر را از خود نشان داد.

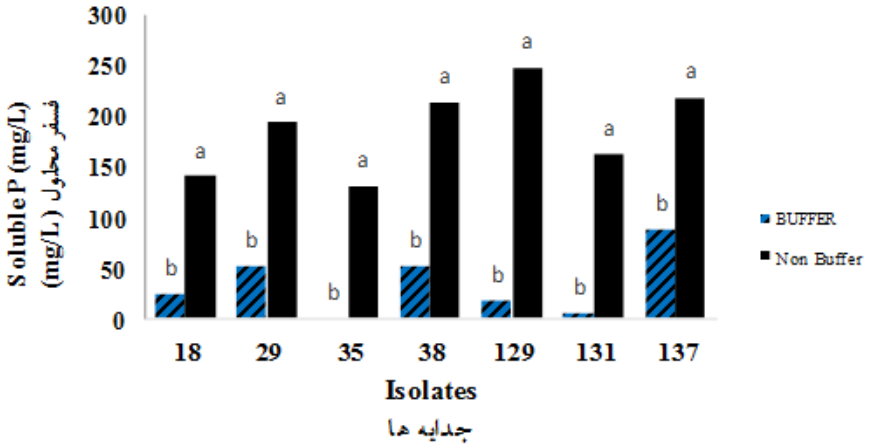
تغییرات pH در شرایط بافر

تغییرات pH در شرایط بافر و غیر بافر با بهره‌گیری از دو منبع سولفات آمونیوم و نیترات سدیم در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که pH در شرایط بافر کاهش کم‌تری نسبت به شرایط غیربافر دارد. دامنه تغییرات pH در شرایط غیربافر برای منبع سولفات‌آمونیوم بین ۳ تا ۴/۵ است، در صورتی که این دامنه برای شرایط بافر از ۴/۸ تا ۶/۲۶ می‌باشد (شکل ۶). برای منبع نیترات‌سدیم نیز دامنه در شرایط غیربافر بین ۴/۵ تا ۵/۵ و برای شرایط بافر بین ۵ تا ۶/۶ می‌باشد و با این وجود و کاهش کم pH هنوز هم حل‌کردن فسفر مشاهده می‌گردد، این موضوع نشان‌دهنده وجود روش-های دیگری، به جز کاهش pH، در حل‌کردن فسفات می‌باشد.



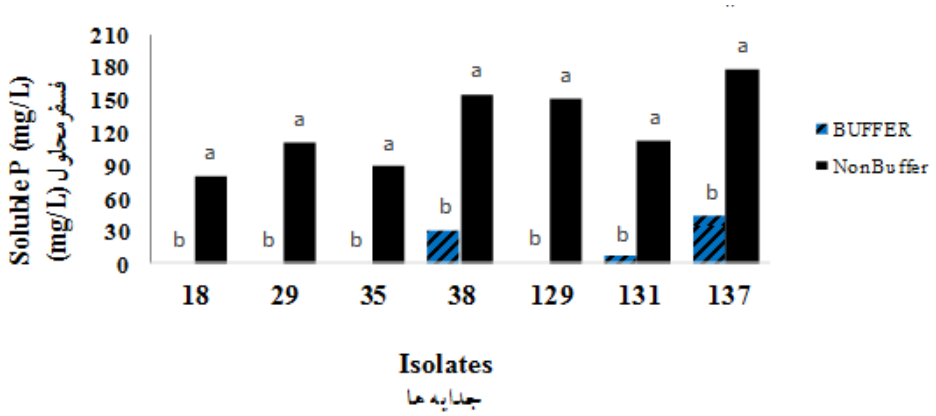
شکل (۳) اثر منابع مختلف نیتروژن بر آزادسازی فسفر از فسفات آلومینیوم

Figure (3) Effect of different nitrogen sources on P release from aluminum phosphate



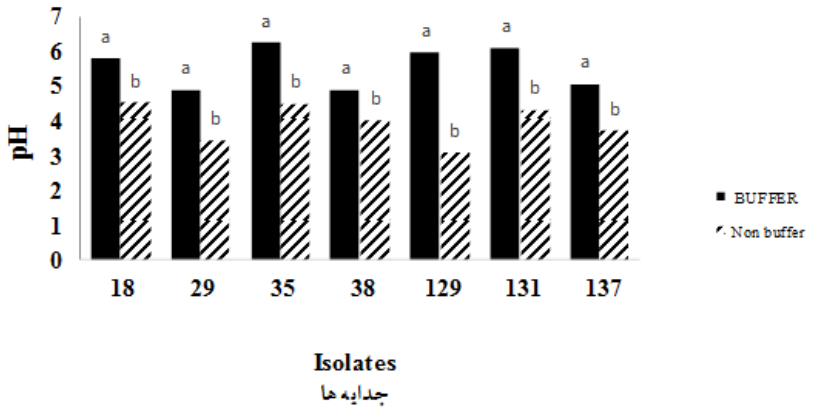
شکل (٤) حل‌کردن تری‌کلسیم فسفات در محیط بافر و غیر بافر دارای سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن

Figure (4) Tri-calcium Phosphate solubilization in buffer and non-buffer medium containing ammonium sulfate as the nitrogen source



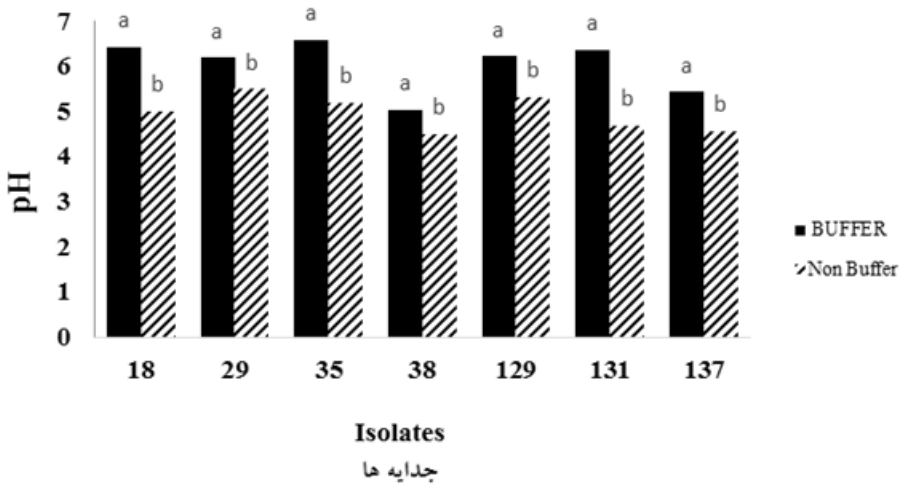
شکل (٥) حل‌کردن تری‌کلسیم فسفات در محیط بافر و غیر بافر دارای نیترات سدیم به عنوان منبع نیتروژن

Figure (5) Tri-calcium Phosphate solubilization in buffer and non-buffer medium containing sodium nitrate as the nitrogen source



شکل (٦) تغییرات pH در محیط بافر و غیربافر NBRIP دارای سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن

Figure (6) pH changes in in buffer and non-buffer NBRIP medium containing ammonium sulfate as the nitrogen source



شکل (۷) تغییرات pH در محیط بافر و غیربافر NBRIP دارای نیترات سدیم به عنوان منبع نیتروژن
Figure (7) pH changes in in buffer and non-buffer NBRIP medium containing sodium nitrate as the nitrogen source

آزادسازی فسفر در محیط‌های مختلف غربالگری

نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه‌ها در محیط NBRIP فسفر بیش‌تری را نسبت به محیط پایکووسکی آزاد می‌کنند و این موضوع در مورد همه جدایه‌ها (غیر از جدایه ۱۳۷) صدق می‌کند (شکل ۸). جدایه ها در دو منبع دیگر روند ثابتی را دنبال نمی‌کنند. دامنه تغییرات pH در محیط NBRIP بین ۳/۱ تا ۴/۴۱ بوده و کم‌ترین و بیش‌ترین اندازه مربوط به جدایه‌های ۱۲۹ و ۱۸ می‌باشد در حالی‌که دامنه تغییرات در محیط اسپربر بین ۳/۶ تا ۴/۸۲ و کم‌ترین و بیش‌ترین اندازه مربوط به جدایه‌های ۲۹و ۱۸ ثبت گردید. این پارامتر در محیط پایکووسکی بین ۳/۸۱ و ۵/۶۷ تغییر نموده و بیش‌ترین و کم‌ترین اندازه مربوط به جدایه های ۱۳۷و ۱۲۹ بوده است (شکل ۹). بیش‌ترین اندازه آزادسازی فسفر در همان محیطی مشاهده شد که بیش‌ترین کاهش pH را نیز داشتیم.

شناسایی جدایه ها

بر پایه یافته های به‌دست آمده از توالی خوانی، اندازه همانندی توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA با جدایه های GenBank با اسنفاده از الگوریتم BLAST مورد مقایسه قرا گرفت. یافته های به‌دست آمده از توالی خوانی در جدول ۳ نشان داده شده است. همان گونه که دیده می‌شود ناهمانندی‌هایی در توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA با گونه های شناخته شده وجود دارد.

بحث

قسمت عمده‌ای از فسفر به کار برده شد در خاک به سرعت تغییر شکل داده و از دسترس گیاه خارج می‌شود. PSB ها در چرخه فسفر خاک نقش اساسی و مهمی ایفا نموده و می‌توانند فسفر را از بخش آلی و معدنی به شکل قابل دسترس گیاه تبدیل کنند. این توانایی به نوع باکتری مایه‌زنی شده به گیاه و خاک بستگی دارد. اسیدی شدن محیط مهمترین مکانیسم این باکتری هاست که در منابع مختلف ذکر شده‌است و در این مطالعه به خوبی مشاهده گردید. حل کردن فسفر در محیط‌های ناهمانند با یکدیگر تفاوت دارد. وضعیت تغذیه‌ای، به خصوص منبع کربن و نیتروژن بر توانایی باکتری‌ها در حل‌کردن فسفر و همچنین بر نوع اسید آلی مترشحه توسط ریزجانداران اثر دارد.

از ۱۰۴ جدایه خالص سازی شده با بهره‌گیری از محیط نوترینت آگار فقط ۲ درصد جدایه‌های به‌دست آمده در کشتگاه حاوی فسفر نامحلول هاله تشکیل دادند؛ در حالی که از ۷۱ جدایه خالص شده از محیط NBRIP، ۲۹ جدایه

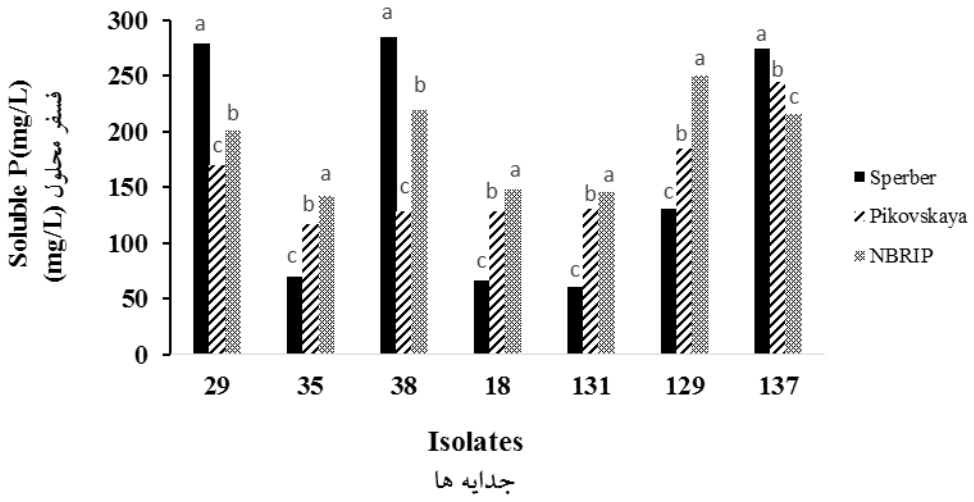
توان تولید هاله پیرامون کلنی‌های باکتریایی را از خود نشان دادند. به عبارت دیگر، ۴۱/۲ درصد از جدایه‌های حاصل از غربالگری اولیه با بهره‌گیری از محیط NBRIP، توان‌مندی تولید هاله در روی محیط مذکور را از خود نشان دادند. چن و همکاران[1] (۲۰۰۶) بیان داشتند که باکتری‌های حل‌کننده فسفات، ۵۰-۱ درصد و قارچ‌های حل‌کننده - فسفات تنها ۰/۵-۰/۱ از جمعیت کل میکروبی خاک را تشکیل می‌دهند (۱). جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، ماده آلی، مقدار فسفر و نیز فعالیت‌های کشاورزی بستگی دارد (۱۰). در شمال ایران، ۳/۹۸ درصد از کل باکتری‌های جداسازی شده را باکتری‌های حل‌کننده فسفات تشکیل داده بودند (۴).

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش به نظر می‌رسد جهت ارزیابی توان حل‌کردن فسفات و کاهش تعداد نمونه‌های اولیه، بهره گیری از محیط مناسب برای جداسازی و غربالگری همزمان، روشی موثرتر از جداسازی با محیط نوترینت آگار و سپس غربالگری آنها است. روش بررسی حل‌کردن فسفات با بهره گیری از توان‌مندی ایجاد هاله معمولا به عنوان یک غربالگری سریع و آغازین صورت گرفته و ممکن است برخی از جدایه‌ها توان تولید هاله را نداشته ولی قادر به حل‌کردن و آزادسازی فسفر در محیط مایع باشند. برای بررسی این مساله افزون بر ۳۱ جدایه توان‌مند در ایجاد هاله، ۹ جدایه دیگر که هاله تشکیل ندادند نیز گزینش شدند. لی وال و بارتلین (۱۹۸۹) بیان داشتند که بهره‌گیری از روش تشکیل هاله در پیرامون کلنی به عنوان شاخص حل‌کردن فسفات، روش مطمئنی نیست، در حالی‌که بر خلاف روش غیرمستقیم اندازه‌گیری حل‌کردن فسفات در روش پلیت، اندازه گیری مستقیم حل‌کردن فسفات در محیط مایع منجر به نتایج قابل اعتمادی خواهد شد. ممکن است یکی از دلایل عدم تشکیل هاله در محیط جامد، ناشی از تفاوت سرعت انتشار آنیون‌های آلی مترشحه از ریزموجودات باشد(۱۱).

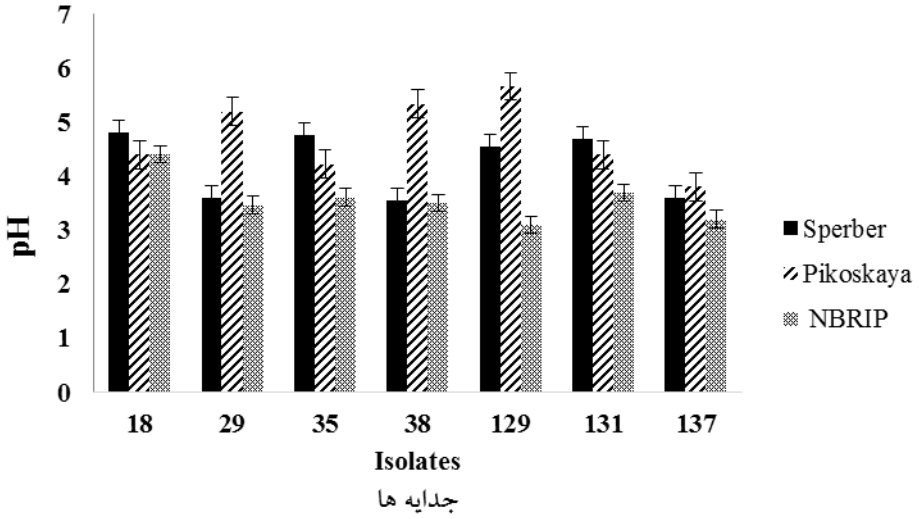
حداکثر اندازه حل‌کردن فسفر جدایه‌های حاصل از ریزوسفر سویا و ذرت در زمان‌های ناهمانندی رخ داد. کلنی‌های حاصل از ریزوسفر سویا تنها جدایه‌هایی بودند که در زمان ۹۶ ساعت بیش ترین مقدار فسفر را از منبع تری-کلسیم فسفات آزاد نمودند. در حالی که بیش تر جدایه‌های به دست آمده از ذرت در زمان ۴۸ ساعت حداکثر حل-کردن فسفر را نشان دادند. لازم به ذکر است که بین قطر هاله به کلنی و حل‌کردن فسفات در محیط مایع همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت ($P<0/001$، $r=0/521$). این یافته‌ها با یافته‌های محققان مختلف مطابقت داشت. چن و همکاران (۲۰۰۶) رابطه معکوس بین pH و حل‌کردن فسفات مشاهده کردند و ترشح اسید آلی توسط ریزموجودات‌ها را عامل حل‌کردن فسفات دانستند (۱). همچنین در این پژوهش مشخص شد که تشکیل هاله روش مناسبی برای تعیین باکتری‌های حل‌کننده‌فسفات نیست زیرا جدایه‌های فاقد توان‌مندی تشکیل هاله، در بررسی حل-کردن فسفات در محیط مایع، قادر به آزادسازی فسفر بوده که نتایج حاصل با یافته‌های نوتیال (۱۹۹۹) مطابقت دارد (۸).

مطابق انتظار، جدایه‌ها توانایی زیادی درآزادسازی فسفر از فسفات آلومینیوم را نداشتند. در بسیاری از موارد ریزموجودات تواتایی بسیار پایین‌تری در حل‌کردن فسفات آلومینیوم در مقایسه با تری‌کلسیم فسفات دارند. چانگ و همکاران (۲۰۰۵) بیان داشتند که توان‌مندی حل‌کردن فسفات آلومینیوم بیش از ۱۰ برابر کم‌تر از آزاد سازی فسفر از تری‌کلسیم فسفات می‌باشد (۲). حل‌کردن فسفات کلسیم به طور نمایی با کاهش pH، افزایش می‌یابد (۱۲) در حالی‌که فسفات آلومینیوم روند ناهمانندی را نسبت به فسفات کلسیم نشان می‌دهد و اسیدی شدن به تنهایی نمی‌تواند عامل حل‌کردن فسفات آلومینیوم در کشت‌های باکتریایی باشد. تشکیل کمپلکس‌های فلزی(به خصوص کی‌لیت کردن) روش اصلی حل‌کردن فسفات آلومینیوم به وسیله ریزموجودات بوده و ناشی از سنتز و آزادسازی گروهی از اسیدهای آلی به وسیله آنها می‌باشد (۱۸).

1- Chen *et al.*



شکل (۸) حل‌کردن تری‌کلسیم فسفات در محیط‌های ناهمانند غربالگری دارای تری‌کلسیم فسفات
Figure (8) Tri-calcium phosphate solubilization in different screening media containing tri-calcium phosphate



شکل(۹) تغییرات pH در محیط‌های مختلف غربالگری دارای تری‌کلسیم فسفات
Fig (9) pH changes in different screening media containing tri-calcium phosphate

ریزموجودات هتروتروف از جمله باکتری‌های حل‌کننده فسفات برای ساختن سلول جدید به منابع کربن و انرژی نیاز دارند. در ریزوسفر گیاهان منابع مختلف کربن و انرژی وجود دارد، که ریزموجودات از این منابع بهره‌گیری می‌کنند.

در این تحقیق مشخص شد که بهترین منبع کربن برای این ریزموجودات گلوکز می‌باشد. بیش ترین اندازه حل‌کردن برای همه‌ی جدایه‌ها مربوط به گلوکز و کم‌ترین مقدار نیز برای همه جدایه‌ها مربوط به گلیسرول می‌باشد. اکثر محققان گلوکز را موثرترین منبع کربنه در حل‌کردن فسفات اعلام کرده و پس از گلوکز منابع مختلفی را موثرتر دانستند. یاداو و همکاران[1] (۲۰۱۳) در بررسی شرایط بهینه حل‌کردن فسفات توسط باکتری

1- Yadav *et al.*

جدول (۳) شناسایی جدایه های برگزیده بر پایه توالی 16S rRNA
Table (3) Identification of the selected isolates based on 16S rRNA

میزان تشابه (٪) Similarity (%)	نزدیکترین سویه شناسایی شده Most closely related isolate	شماره دسترسی در GenBank GenBank accession No.	جدایه‌ها Isolates
99.48	*Enterobacter cloacae subsp. dissolvens ATCC 23373*	KM024464	18
99.19	*Pantoea dispersa DSM 30073*	KM024465	21
99.74	*Enterobacter xiangfangensis 10-17*	KM024466	29
98.99	*Enterobacter ludwigii EN-119*	KM024467	35
99.73	*Enterobacter xiangfangensis 10-17*	KM024468	38
100	*Enterobacter ludwigii EN-119*	KM024469	129
99.63	*Enterobacter cloacae subsp. Dissolvens* LMG 2683	KM024470	131
99.55	*Enterobacter xiangfangensis 10-17*	KM024471	137

Brevibacillus sp، گزارش کردند که گلوکز موثرتر از فروکتوز بوده و ۱۴۰ درصد فسفر را نسبت به فرکتوز بیش‌تر آزاد نمود. همچنین محققان مذکور بیان داشتند که کم‌ترین اندازه آزاد سازی فسفر مربوط به محیط دارای منبع گلیسرول می‌باشد (۲۷). در این آزمایش گلوکز موثرتر از فروکتوز بوده، ولی اندازه تاثیر آن در جدایه‌های مختلف ناهمانند بوده است. کاهش pH و ساخت و رها سازی اسیدهای آلی از سازوکارهایی است که در حل کردن فسفر کارایی دارند. در ریزجانداران گوناگون، قندهای محیط کشت در مسیرهای متابولیکی ویژه ای بهره‌گیری شده و از آنها اسیدهای آلی گوناگونی ساخته و رها می شود (۲۵). تفاوت در نوع و غلظت اسید آلی مترشحه می‌تواند میزان رهاسازی فسفر را تحت تاثیر قرار دهد.

در بررسی اثر منبع نیتروژنی بر آزادسازی فسفرمشاهده شد که، سولفات‌آمونیوم موثرتر از دو منبع دیگر بوده است. شاران و همکاران[1] (۲۰۰۸) در بررسی توان‌مندی آزادسازی فسفر از منابع مختلف نیتروژنی توسط باکتری *Xanthomonas campestris* گزارش کردند که سولفات‌آمونیوم با آزادسازی ۶۷ درصد فسفر از تری‌کلسیم فسفات موثرترین منبع و نیترات سدیم نیز با ۴۸ درصد در جایگاه بعدی قرار گرفت (۲۰)؛ همچنین پارک و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی باکتری *Burkholderia vietnamiensis* مشاهده کردند که این باکتری در محیط دارای سولفات-آمونیوم ۶۸ درصد فسفر موجود در محیط و در منبع نیترات سدیم ۵۶/۶ درصد فسفر را آزاد کردند. بیش‌ترین حل‌کردن فسفات زمانی رخ داد که سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژنی مورد بهره‌گیری قرار گرفت و اختلاف معنی‌داری با نیترات سدیم و آرژینین داشت (۱۶). کارونی و راویندرین[2] (۲۰۱۲) در بررسی منابع مختلف نیتروژن بر روی حل‌کردن فسفات به وسیله باسیلوس بیان داشتند که بیش ترین اندازه حل‌کردن تری‌کلسیم فسفات در محیط دارای سولفات آمونیوم صورت گرفته است (۷). همچنین اندازه آزادسازی فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات در محیط دارای آرژینین

1- Sharan *et al.*

2- Karunai & Ravindran

کم‌ترین مقدار را نشان داد. این نتایج با یافته‌های استفانونی روبیو وهمکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت. روی‌هم‌رفته حل‌کردن فسفات در کاربرد نیتروژن آلی کم‌تر از هنگامی است که از نیتروژن کانی در زیستگاه ریزجانداران بهره‌گیری شود و ماهیت و زیست فراهمی نیتروژن می‌تواند سازوکار حل کردن فسفر را دگرگون کند (۲۳).

از آنجا که خاک محیط بافربوده و در مقابل تغییرات pH مقاومت می‌نماید، لذا مهمترین روش حل‌کردن تری‌کلسیم فسفات را بی اثر می‌کند. بنابراین یافتن جدایه‌ای توان‌مند در حل‌کردن تری‌کلسیم فسفات در شرایط بافر، مناسب و مفید خواهد بود. در این مطالعه مشخص شد اندازه آزادسازی فسفر در محیط بافر به شدت کاهش می‌یابد و این کاهش احتمالا می‌تواند به دلیل توانایی ناهمانند جدایه‌ها در شرایط بافر و غیربافر در تولید و ترشح اسیدهای آلی به محیط باشد. اندازه اسید آلی مترشحه توسط PSB ها در شرایط بافر ۲۰ تا ۵۰ برابر کم‌تر از اندازه مورد نیاز برای حل‌کردن فسفر می‌باشد (۶) و حل کردن فسفات در محیط‌های بافر نشان می‌دهد که سایر روش‌های حل‌کردن از جمله منابع کمپلکس کننده (کی‌لیت کننده) در محیط‌های مذکور عمل نموده و احتمالا نوع اسید (های) آلی ترشح شده و غلظت آنها در جدایه‌ها، تفاوت دارد.

محققان مختلف برای مطالعه آزادسازی فسفر در شرایط آزمایشگاهی و در محیط مایع از محیط‌های ناهمانندی بهره‌گیری می‌کنند. به دلیل آنکه گروه‌های مختلف باکتریایی ممکن است در محیط‌های مختلفی حداکثر حل کردن فسفات را از خود نشان دهند، لذا برای یافتن بهترین محیط جهت تعیین آزادسازی فسفر، محیط های اسپربر، پایکووسکی نیز مورد بهره گیری قرار گرفتند. نوتیال (۱۹۹۹) در بررسی هشت جدایه از جنس‌های مختلف در محیط‌های NBRIP (۱۴) و پایکووسکی (۱۷) مشاهده کرد که هر هشت جدایه در محیط NBRIP فسفر بیش‌تری را در مقایسه با محیط پایکووسکی آزاد کردند، این توانایی در بعضی موارد تا سه برابر بیش تر بوده است. در مقایسه محیط اسپربر با دو محیط دیگر نیز نظم کم‌تری مشاهده می‌شود؛ به این صورت که بعضی جدایه‌ها در محیط اسپربر (۲۲) بیش‌تر از محیط NBRIP و پایکووسکی و در بعضی جدایه‌ها فسفر کم‌تری را آزاد کرده است. این مساله می‌تواند به دلیل ترجیح جدایه‌های مختلف در بهره‌گیری از اجزاء ناهمانند موجود در محیط‌های کشت مختلف باشد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که سازوکار مورد بهره‌گیری برای غربالگری می‌تواند تاثیر بسیار زیادی بر اندازه جداسازی باکتری‌های حل کننده فسفات داشته باشد، به طوری که بهره‌گیری از محیط NBRIP کارایی بهتری نسبت به محیط NA در این زمینه داشت. بهره گیری از روش غربالگری در محیط جامد به تنهایی نمی تواند نشان دهنده توان‌مندی بالقوه جدایه ها در آزادسازی فسفر باشد. اندازه آزادسازی فسفر ازمنابع مختلف فسفر نامحلول متفاوت است، به‌طوری‌که بیش‌ترین اندازه انحلال فسفات از منبع تری-کلسیم فسفات بود. روش اصلی در آزادسازی فسفر از منبع تری-کلسیم فسفات، بر خلاف فسفات آلومینیوم، کاهش pH محیط بود. همچنین منبع کربن و نیتروژن و نوع محیط کشت نیز به شدت بر اندازه آزادسازی فسفر موثر بود. با توجه به نتایج به دست آمده می توان انتظار داشت که جدایه‌های منتخب مورد بهره‌گیری بتوانند منجر به بهبود رشد و عملکرد گیاه شوند، لذا برای بررسی توان‌مندی جدایه‌های مذکور، بهره گیری از آن‌ها جهت سنجش بهبود رشد شاخص‌های رشد و جذب فسفر گیاه ضروری می‌باشد.

منابع

1. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W., and Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology, 34:33–41.

2. Chung, H., Park, M, Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., and Sa, T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biology and Biochemistry, 37:1970–1974.

3. Duponnois, R., Colombet, A., Hien, V., and Thioulouse, J. 2005. The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. Soil Biology and Biochemistry, 37: 1460-1468.

4. Fallah, A. 2006. Abundance and distribution of phosphate solubilizing bacteria and fungi in some soil samples from North of Iran. In: 18th Congress of Soil Science, Philadelphia, p. 19283.

5. Farhat, M.B., Farhat, A., Bejar, W., Kammoun, R., Bouchaala, K., Fourati, A., Antoun, H., Bejar, S., and Chouayekh, H. 2009. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. Archives of Microbiology, 191:815–824.

6. Gyaneshwar P, Naresh K.G., Parekh, L.J. 1998. Effect of buffering on the phosphate solubilizing ability of microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14:669–673.

7. Karunai Selvi, B., and Ravindran, A.D. 2012. Influence of different carbon and nitrogen source on insoluble inorganic phosphate solubilizatuon by *Bacillus Subtilis*. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 2(3): 441-445.

8. Khan, M.S., Ziadi, A., and Wani, P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. Agronomy for Sustainable Development, 27 :29–43.

9. Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., and Wani, P.A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi- current perspective. Archives of Agronomy and Soil Science, 56:73–98.

10. Kim, K.Y., Jordan, D., and McDonald, G.A. 1998. Enterobacter agglomerans, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soil: effect of carbon sources. Soil Biology and Biochemistry, 30: 995–1003.

11. Leyval, C., and Barthelin, J. 1989. Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: infuence on P, K, Mg and Fe mobilization from mineral and plant growth. Plant and Soil, 17: 103-110.

12. Merbach, W., Deubel, A., Gransee, A., and Klamroth, A. 2010. Phosphorus solubilization in the rhizosphere and its possible importance to determine phosphate

plant availability in soil. A review with main emphasis on German results. Archives of Agronomy and Soil Science. 56: 119–138.

13. Mihailescu, E., Murphy, P.N.C., Ryan, W., and Casey, I.A. 2015. Phosphorus balance and use efficiency on 21 intensive grass-based dairy farms in the South of Ireland. JAS, 153(3): 520–537.

14. Nautiyal, C.S .1999. An efficient microbiological growth medium for screening of phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170: 265–270.

15. Nazir, R., Warmink, J., Boersma, H., and van Elsas, J.D. 2009. Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. FEMS Microbiology Ecology, 71:169-185.

16. Park, K.H., Lee, O.M., Jung, H.I., Jeong, J.H., Jeon, Y.D., Hwang, D.Y., Lee, C.Y., and Son, H.J. 2010. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. Applied Microbiology and Biotechnology, 86:947–955.

17. Pikovskaya, R. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Microbiology, 17:362–370

18. Puente, M.E., Li, C.Y., and Bashan, Y. 2009. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. Environmental and Experimental Botany, 66: 389–401.

19. Richardson, A.E. 2007. Making microorganisms mobilize soil phosphorus. In: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds) First international meeting on microbial phosphate solubilization. Developments in plant and soil sciences, vol 102. Springer, Netherlands, pp 85–90.

20. Sharan, A., Shikha, D.N.S., and Gaur, R. 2008. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate solubilizing bacterial strain from saline-alkali soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24:753-759.

21. Song, O.R., Lee, S.J., Lee, Y.S., Lee, S.C., Kim, K.K., and Choi, Y.L. 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by Burkholderia cepacia DA23 isolated from cultivated soil. Brazilian Journal of Microbiology, 39: 151–156.

22. Sperber, J.I. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research, 9:778–781.

23. Stefanoni Rubio, P.J., Godoy, M.S., Della Mo´nica, I.F., Pettinari, M.J., Godeas, A.M., and Scervino, J.M. 2016. Carbon and nitrogen sources influence tricalcium phosphate solubilization and extracellular phosphatase activity by Talaromyces flavus. Current Microbiology, 72: 41–47.

24. Sulbaran, M., Pe´rez, E., Ball, M.M., Yarza´bal, L.A., and Bahsas, A. 2009. Characterization of the mineral phosphate-solubilizing activity of Pantoea aglomerans mmb051 isolated from an iron-rich soil in south eastern Venezuela (Bolıvar state). Current Microbiology, 58:378–383.

25. Vinopal, R.T., Romano, A.H. 2000. Carbohydrate synthesis and metabolism. In: Lederberg J (ed) Encyclopedia of microbiology, vol 1, 2nd edn. Academic, San Diego, pp 647–668.

26. Whitelaw, M. 2000. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Advances in Agronomy, 69:99–151.

27. Yadav, H., Gothwal, R.K., Nigam, V.K., Sinha-Roy, S., and Ghosh, P. 2013. Optimization of culture conditions for phosphate solubilization by a thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacteriumBrevibacillus sp. BISR-HY65 isolated from phosphate mines. International Society of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2 (3): 217-225.